



UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA

Wydział Biologii

Zakład Bioenergetyki

Hanna Gałgańska

**Zmiany stanu oksydacyjno – redukcyjnego
cytoplazmy jako element komunikacji
jądro komórkowe – mitochondria**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. UAM dr hab. Hanny Kmity

Poznań, 2010

Dziękuję wszystkim, którzy w jakikolwiek sposób przyczynili się do powstania niniejszej pracy, a szczególnie:

Prof. Hannie Kmicie

Dr Małgorzacie Budzińskiej

Dr. Olgierdowi Stobieni

Dr Małgorzacie Wojtkowskiej

Mgr. Andonisowi Karachitosowi

oraz pracownikom, doktorantom i magistrantom Zakładu Bioenergetyki za nieocenioną pomoc w realizacji badań i poświęcony czas.

Chciałabym jednocześnie serdecznie podziękować wszystkim pracownikom i doktorantom Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM za miłą atmosferę, życzliwą pomoc i wszelki wkład, jaki wnieśli w powstanie tej pracy.

Specjalne podziękowania kieruję w stronę dr Małgorzaty Jakubowicz, która wprowadziła mnie w fascynujący świat nauki.

Mojemu mężowi i córeczce...
Moim rodzicom, bratu i babciom...

Spis treści

1	Wykaz stosowanych skrótów	7
2	Wstęp	9
2.1	Wprowadzenie	9
2.2	Ewolucja mitochondriów	9
2.3	Mitochondrialny system transportu białek i metabolitów	11
2.3.1	Kompleksy importowe zewnętrznej błony mitochondrialnej	13
2.3.2	Budowa i funkcje kanału VDAC	17
2.4	Komunikacja między jądrem komórkowym i mitochondriami	20
2.4.1	Rola reaktywnych form tlenu w komunikacji między jądrem i mitochondriami	20
2.4.2	Ochrona antyoksydacyjna	23
3	Cel pracy	25
4	Materiały	26
4.1	Materiał biologiczny	26
4.1.1	Drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
4.1.2	Bakterie <i>Escherichia coli</i>	26
4.2	Konstrukty plazmidowe	26
4.3	Przeciwciężła	26
4.4	Pożywki	26
4.4.1	Pożywki do hodowli drożdżowej	26
4.4.2	Pożywka do hodowli bakterii	27
4.5	Bufory do preparacji sferoplastów	27
4.6	Bufory do izolacji mitochondriów	27
4.7	Bufory do elektroforezy, elektrotransferu i immunodetekcji białek	28
4.7.1	Bufor Lämmli	28
4.7.2	Bufor SDS-PAGE	28
4.7.3	Bufor do barwienia żeli akrylamidowych	28
4.7.4	Bufor do odbarwiania żeli akrylamidowych	28
4.7.5	Bufor do elektrotransferu	28
4.7.6	Bufor TBS	28
4.8	Bufory do importu białek do mitochondrium	29
4.8.1	Bufor do importu białka Tob55	29
4.8.2	Bufor do importu białka Su9-DHFR	29
4.8.3	Bufor do importu białka Pb ₂ -DHFR	29
4.8.4	Bufor przemywający do importu Su9-DHFR	29
4.8.5	Bufor SM	30
4.9	Inne bufory	30
4.9.1	Bufory do oczyszczania białka pb ₁₂ -DHFR po nadekspresji	30
4.9.2	Bufor M	31
4.9.3	Bufor HS	31
4.9.4	Płyn do pomiaru uszkodzenia zewnętrznej błony mitochondrium i stopnia zużycia tlenu	31
4.9.5	Bufory do elektroforezy kwasów nukleinowych	31
4.10	Żele do elektroforezy	32
4.11	Startery	32
5	Wykaz stosowanych odczynników	35
6	Metody	37

6.1	Hodowla drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
6.1.1	Modyfikacje hodowli drożdżowych	37
6.1.2	Przygotowywanie stoków drożdżowych	37
6.2	Badanie wpływu inhibitora transkrypcji i translacji	37
6.3	Preparacja sferoplastów drożdży	38
6.4	Izolacja mitochondriów i frakcji cytozolowej.....	38
6.4.1	Badanie jakości preparatu mitochondrialnego	39
6.5	Preparacja mitoplastów	39
6.6	Metody pracy z białkami.....	40
6.6.1	Pomiar stężenia białka metodą Bradford.....	40
6.6.2	Wytrącanie białka.....	40
6.6.3	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu sodu (SDS-PAGE).....	40
6.6.4	Elektrotransfer półsuchy.....	40
6.6.5	Immunodetekcja białek	41
6.7	Pomiar uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego.....	41
6.8	Określenie wewnątrzkomórkowego stanu redoks.....	41
6.9	Pomiar aktywności enzymów antyoksydacyjnych.....	43
6.10	Metody stosowane w ocenie ekspresji genów na poziomie mRNA.....	44
6.10.1	Izolacja RNA z drożdży z wykorzystaniem Trizolu.....	44
6.10.2	Traktowanie preparatów RNA DNazą	44
6.10.3	Odwrotna transkrypcja	45
6.10.4	PCR w czasie rzeczywistym.....	45
6.11	Metody stosowane podczas klonowania DNA.....	46
6.11.1	Amplifikacja metodą PCR	46
6.11.2	Ligacja	46
6.11.3	Transformacja komórek kompetentnych mieszaniną ligacyjną	46
6.11.4	Przeszczepienie kolonii bakteryjnych	47
6.11.5	Zaszczepienie pożywek do izolacji plazmidów	47
6.11.6	Izolacja ultraczystego plazmidowego DNA.....	47
6.11.7	Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych.....	47
6.11.8	Sekwencjonowanie	47
6.12	Nadekspresja białka pb ₁₂ -DHFR	47
6.13	Oczyszczanie białka pb ₁₂ -DHFR po nadekspresji	48
6.14	Import białka do mitochondrium	48
6.14.1	Transkrypcja <i>in vitro</i>	48
6.14.2	Translacja <i>in vitro</i>	49
6.14.3	Import białka do mitochondriów.....	49
6.14.4	Autoradiografia.....	50
6.14.5	Blokada kompleksu TOM przez chemiczne ilości białka chimerowego pb ₂ -DHFR	50
7	Wyniki	52
7.1	Ocena jakości preparatów mitochondriów szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$	52
7.2	Izoformy białka VDAC pośredniczą w determinacji stanów oksydacyjno-redukcyjnych (redoks) w komórkach <i>S. cerevisiae</i>	52
7.2.1	Stan redoks w obrębie cytozolu komórek <i>S. cerevisiae</i> zależy od izoform białka VDAC i fazy wzrostu	53

7.2.2	Stan redoks mitochondriów <i>S. cerevisiae</i> zależy od izoform białka VDAC i fazy wzrostu	54
7.3	Poziom uwalniania anionorodnika ponadtlennowego ($O_2^{\cdot-}$) z mitochondriów zależy od izoform białka VDAC i fazy wzrostu.....	55
7.4	Stan redoks w obrębie cytozolu jest istotny dla poziomu ekspresji białek tworzących kanały w kompleksach importowych zewnętrznej błony mitochondrialnej. ...	56
7.5	Dodanie utleniacza lub reduktora podczas wzrostu komórek badanych szczepów drożdży pozwala na uzyskanie fazy logarytmicznej z wartościami wewnątrzkomórkowych stanów redoks odpowiadającymi fazie stacjonarnej.....	58
7.5.1	Stan redoks w obrębie cytozolu w przypadku modyfikowanej fazy logarytmicznej wzrostu odpowiada wartości tego parametru w fazie stacjonarnej	59
7.5.2	Stan redoks w obrębie mitochondriów w modyfikowanej fazie logarytmicznej wzrostu odpowiada wartości tego parametru w fazie stacjonarnej	60
7.6	W komórkach <i>S. cerevisiae</i> izoformy białka VDAC uczestniczą w regulacji aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych, zlokalizowanych w cytozolu i w mitochondriach.....	61
7.6.1	Aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych zlokalizowanych w cytozolu zmienia się w sposób zależny od fazy wzrostu badanych komórek i stanu redoks	61
7.6.2	Aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych zlokalizowanych w mitochondriach zmienia się w sposób zależny od fazy wzrostu badanych komórek i stanu redoks	63
7.7	Modyfikacja wewnątrzkomórkowych stanów redoks prowadzi do zmian ekspresji podjednostek kompleksów importowych zewnętrznej błony mitochondrialnej i dysmutaz ponadtlennowych.....	64
7.7.1	Poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów jest istotny dla stanu redoks w obrębie cytozolu i poziomu ekspresji białka Tom40	68
7.7.2	Kompleks TOM uczestniczy w uwalnianiu $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów.....	70
7.7.3	Blokada kompleksu TOM hamuje uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów.....	70
7.7.4	Poziom wiązania białka pb ₂ -DHFR w warunkach stabilnej blokady kompleksu TOM oraz kompleksu TIM23 (import + MTX) wykazuje korelację z poziomem ekspresji białka Tom40 i poziomem hamowania uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów.....	72
7.7.5	Hamowanie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów w wyniku blokady kompleksu TOM wymaga integralności strukturalnej kompleksu TOM i zewnętrznej błony mitochondrialnej	73
7.8	Działanie α -amanityny i cykloheksymidu zależy od wewnątrzkomórkowych stanów redoks.....	76
7.9	Kanał VDAC pośredniczy w regulacji poziomu mRNA w sposób zależny oraz niezależny od wewnątrzkomórkowych stanów redoks.....	78
7.9.1	Wewnątrzkomórkowy stan redoks jest istotnym czynnikiem, regulującym poziom mRNA.....	78
7.9.2	W regulacji poziomu mRNA, kodujących białka jądrowe wrażliwe na zmiany wewnątrzkomórkowych stanów redoks, w tym czynniki transkrypcyjne, oraz białka uczestniczące w komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami, kluczową rolę odgrywa funkcja kanałowa białka VDAC	81
7.9.3	Białko VDAC1 wpływa na poziom transkryptów poprzez mechanizm zależny, jak i niezależny od wewnątrzkomórkowych stanów redoks	84
7.10	Import białka do mitochondriów zależy od wewnątrzkomórkowych stanów redoks.....	86
8	Dyskusja	90
9	Streszczenie	100
10	Bibliografia	102

1 Wykaz stosowanych skrótów

ADP – adenosynodifosforan

ANT – translokaza nukleotydów adeninowych

AOX – oksydaza alternatywna

APS – nadsiarczan amonu, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

ATP – adenosynotryfosforan

BAM – kompleks zewnętrznej błony bakterii, bierze udział w sortowaniu białek

BSA – albumina surowicy wołu

CC₁HL – liaza hemowa cytochromu C₁

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DsbA/B – kompleks utleniający w przestrzeni międzybłonowej bakterii

DTT – ditiotretiol

ECL – wzmocniona chemiluminescencja

EDTA – etylenodwuaminocztteroctan

EGTA – kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy

GPx – peroksydaza glutationowa

GR – reduktaza glutationowa

GSH – glutation

GST – transferaza glutationu

GSSG – disulfid glutationu

HEPES – kwas N- (2-hydroksyetylo) piperazyno – N-2-etanosulfonowy

IPTG – izopropylotiogalaktozyd

KO – współczynnik kontroli oddechowej, tj. stosunek szybkości oddychania uzyskanej podczas syntezy ATP (w obecności ADP) do szybkości oddychania przy braku syntezy ATP, tj. stanu 4

KO' – współczynnik kontroli oddechowej, tj. stosunek szybkości oddychania uzyskanej podczas syntezy ATP (w obecności ADP) do szybkości oddychania przy braku syntezy ATP, tj. stanu 2

Mas37 – składnik kompleksu TOB/SAM

MIA – kompleks kierujący białka do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów

Mdm10 – białko związane z morfologią i dystrybucją mitochondriów

Mim – białko związane z importem białka do mitochondriów

Mmm2 – białko związane z utrzymaniem morfologii mitochondrium

MOPS – kwas morfolinopropanosiarczanowy

NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NADPH – forma zredukowana NADP⁺

PMSF – fluorek fenylometylosulfonylu

NTP – trifosforany rybonukleotydów

Omp85 – białko błony zewnętrznej bakterii, odpowiedzialne za wbudowywanie białek w błonę zewnętrzną

PAM – motor importowy, uznawany za integralną część kompleksu TIM23

PTP – kanał o wysokiej przewodności

RFT – reaktywne formy tlenu

SEC – translokaza błony wewnętrznej bakterii

SDS – dodecylosiarczan sodu

SOD – dysmutaza nadtlenkowa

TAT – translokaza błony wewnętrznej bakterii

TCA – kwas trójchlorooctowy

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina

TIM – translokaza wewnętrznej błony mitochondrialnej

TMPD – tetrametylo - p - fenylodiamina

TOB/SAM – kompleks biorący udział w biogenezie, sortowaniu i składaniu białek o strukturze beczułki β

TOM – translokaza zewnętrznej błony mitochondrialnej

TPP⁺ – kation tetrametylofosfoniowy

TRIS – 3-hydroksymetyloaminoocetan

VDAC – zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej

YidC – translokaza błony wewnętrznej bakterii

$\Delta por1$ – mutant drożdżowy pozbawiony izoformy białka VDAC1

$\Delta por2$ – mutant drożdżowy pozbawiony izoformy białka VDAC2

2 Wstęp

2.1 Wprowadzenie

Mitochondria stanowią centrum energetyczne komórki. Dzięki zachodzącym w nich procesom metabolicznym, takim jak cykl kwasów trójkarboksylowych (cykl Krebsa) i fosforylacja oksydacyjna, są głównym miejscem produkcji ATP, niezbędnego do prawidłowego przebiegu podstawowych funkcji życiowych. Mitochondria to także istotne miejsce regulacji stanu oksydacyjno-redukcyjnego (redoks) w komórce oraz inicjowania i egzekucji programowanej śmierci komórki (apoptozy). Większość białek mitochondrialnych kodowana jest przez geny jądrowe, ulega translacji na rybosomach cytoplazmatycznych, a następnie importowana jest do odpowiednich przedziałów mitochondrialnych. Mutacje w genomie mitochondrialnym lub genomie jądrowym, kodującym białka mitochondrialne, mogą być przyczyną zaburzeń funkcji mitochondriów i – w efekcie – podłożem chorób całego organizmu. Na przykład, badania ostatnich lat wskazują na występowanie w wielu typach nowotworów zwiększonej częstości mutacji w mitochondrialnym DNA (Mithani i in., 2009; Shoshan-Barmatz i in., 2010).

Prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów wymaga skutecznej komunikacji między mitochondriami i jądrem komórkowym, a także właściwie regulowanego importu białek i transportu metabolitów. W toku ewolucji powstały drogi transportu metabolitów przez błony mitochondrialne oraz kompleksy białkowe, odpowiedzialne za translokację białek przez błony mitochondrialne, wbudowywanie w nie, jak również składanie podjednostek w większe kompleksy (patrz Wstęp, p. 2.2). W przypadku błony zewnętrznej mitochondriów za import białek odpowiedzialne są kompleksy TOM i TOB/SAM, natomiast kanał VDAC odpowiada za transport metabolitów, takich jak ATP, ADP czy substraty dla łańcucha oddechowego (patrz Wstęp, p. 2.3). Istnieją dwa mechanizmy gwarantujące prawidłowy przebieg komunikacji między jądrem a mitochondriami. Pierwszy z nich polega na regulacji ekspresji genów mitochondrialnych w odpowiedzi na czynniki endogenne i środowiskowe, które są przekazywane do jądra, podczas gdy drugi mechanizm przekazuje sygnały zapoczątkowane w mitochondriach i regulujące ekspresję genów jądrowych (patrz Wstęp, p. 2.4).

2.2 Ewolucja mitochondriów

Pierwsze organizmy prokariotyczne pojawiły się ok. 3,8 miliarda lat temu, podczas gdy organizmy eukariotyczne ok. 1,5 miliarda lat temu. Dostępne dane wskazują, że decydujące dla powstania mitochondriów i stąd współczesnych

eukariontów było wchłonięcie α -proteobakterii przez inną komórkę, prawdopodobnie archebakterię (Kutik i in., 2009). Oznacza to, iż pojawienie się endosymbionta, będącego prekursorem mitochondrium mogło poprzedzać w czasie powstanie jądra komórkowego (Cavalier-Smith, 2009). Niezależnie od kolejności wydarzeń w ewolucji komórki eukariotycznej obie błony mitochondrialne powstały prawdopodobnie z błon endosymbionta, otoczonego także dwoma błonami (Gatsos i in., 2008). Matriks mitochondrialna odpowiada cytozolowi komórki endosymbionta, a przestrzeń międzybłonowa przestrzeni peryplazmatycznej. Mitochondria odziedziczyły po bakteryjnych przodkach nie tylko przedziały, ale także pełnione przez nie funkcje. W matriks pozostał genom, maszyna do syntezy białek i elementy związane z powstawaniem centrów żelazowo – siarkowych, zaś w błonie wewnętrznej pozostały kompleksy łańcucha oddechowego. Jednakże współczesne mitochondria zawierają nie tylko białka wywodzące się z bakterii. Liczne geny powstały po uformowaniu się organizmów eukariotycznych, zatem wiele białek kierowanych do mitochondrium nie było obecnych u bakteryjnego przodka (Kutik i in., 2009).

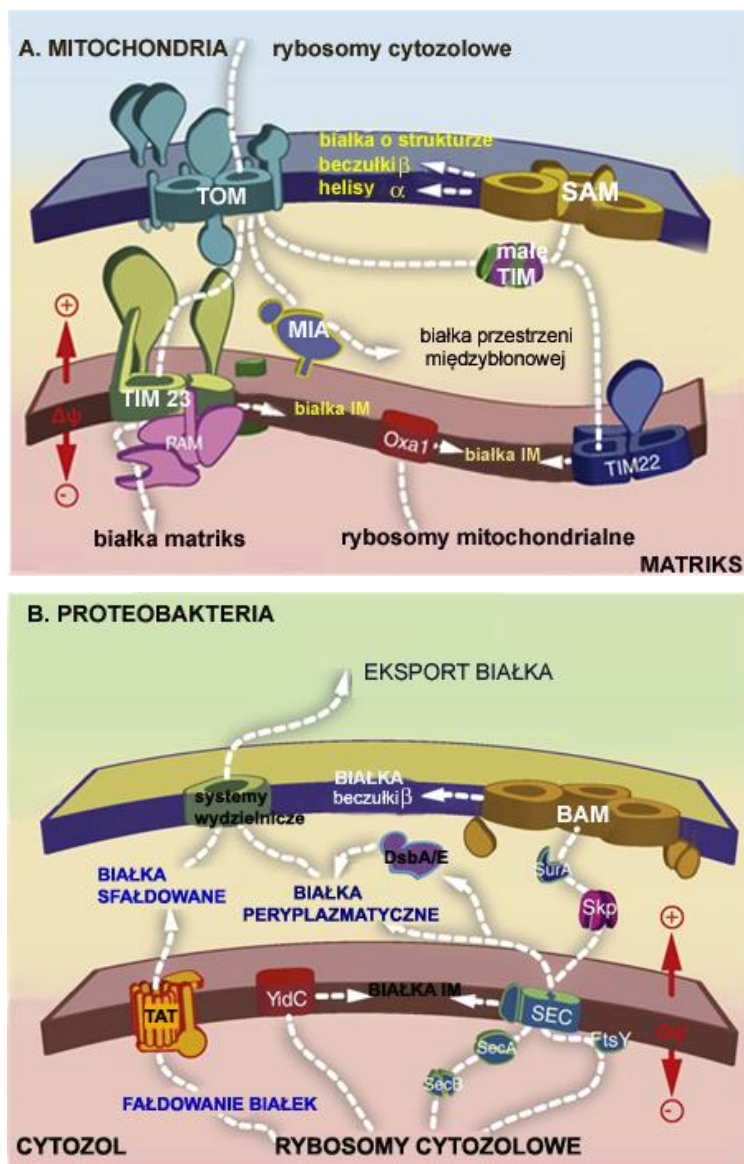
Z biegiem czasu większość genów endosymbionta została utracona lub przeniesiona i zintegrowana z genomem gospodarza, przy czym nadal dyskutuje się kwestię, czy powstanie aparatu importu białka do mitochondriów było przyczyną czy też konsekwencją utraty genów przez endosymbionta (Dolezal i in., 2006). We współczesnych komórkach 90-99% białek mitochondrialnych kodowanych jest przez geny jądrowe (Dolezal i in., 2006). Nie ulega jednak wątpliwości, iż procesy metaboliczne przebiegające w komórce endosymbionta miały kluczowe znaczenie dla jego pozostania w obrębie komórki gospodarza (Kutik i in., 2009). Obecnie, zarówno błona zewnętrzna, jak i wewnętrzna oraz przestrzeń błonowa i matriks mitochondrialna są wyposażone w zestawy charakterystycznych białek, wymaganych do przekształcania energii i transportu metabolitów, przy czym w toku ewolucji komórki eukariotycznej procesy metaboliczne uległy znaczącym zmianom (Dolezal i in., 2006). Import białek do różnych przedziałów mitochondriów musi być oczywiście ściśle skoordynowany (Becker i in., 2009, Kutik i in., 2009). Dzięki przeniesieniu genów, kodujących białka endosymbionta, i pojawieniu się nowych genów, a także powstaniu aparatu importu białka do mitochondriów, ustalona została komunikacja jądro – mitochondria, która umożliwia dostosowanie funkcjonowania mitochondriów do aktualnie istniejących warunków, które wynikać mogą między innymi z procesów zachodzących w samych mitochondriach.

2.3 Mitochondrialny system transportu białek i metabolitów

Import białka do mitochondriów, jak również transport metabolitów, to procesy kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania tych organelli. Import białek wymaga transportu metabolitów zapewniających właściwe zasilanie energetyczne, z kolei większość białek uczestniczących w przekształceniach energetycznych kodowana jest przez genom jądrowy, co oznacza konieczność ich importu do odpowiednich przedziałów mitochondrialnych, w tym błon mitochondrialnych. W mitochondriach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano 850 różnych białek (Schmidt i in., 2010). Około 30% z nich jest integralnymi białkami błonowymi. Wszystkie białka błonowe, z wyjątkiem siedmiu kodowanych przez mitochondrialne DNA, są kodowane w jądrze i syntezowane na rybosomach cytoplazmatycznych, skąd muszą być importowane (Becker i in., 2009). Białka kierowane do określonych przedziałów komórkowych zawierają zróżnicowane sygnały, zarówno w regionie wewnętrznym jak i na końcach aminowym i karboksylowym, które umożliwiają ich rozpoznanie i translokację (Neupert i Herrmann, 2007).

Białka bakteryjne przeznaczone do błony wewnętrznej, przestrzeni peryplazmatycznej i błony zewnętrznej, także zaopatrzone są w sekwencje sygnałowe. Po wchłonięciu przez komórkę gospodarza, endosymbiont znalazł się w nowym środowisku, które było zaopatrzone m.in. w aparat syntezy białka. Geny endosymbionta mogły zostać zintegrowane z genomem gospodarza i użyte przez niego, jako matryca do syntezy białek. Dlatego nie było dalszej potrzeby eksportowania prekursorowych białek poza organizm endosymbionta, co doprowadziło do zaniknięcia bakteryjnego systemu eksportu białek przez błonę zewnętrzną (Saier Jr., 2006). Na skutek utraty zdolności biosyntezy białek koniecznych do funkcjonowania endosymbionta niezbędny stał się aparat importu białek do mitochondrium, rozpoznający sekwencje kierujące białka do odmiennych przedziałów.

Najlepiej poznane są sekwencje kierujące, występujące na końcu aminowym, tzw. presekwencje. Kierują one wiele mitochondrialnych prekursorów do kompleksu TOM. Jest to jedyne znane miejsce importu białka przez zewnętrzną błonę mitochondrialną (rys. 2.1) Stamtąd białka przechodzą na kompleks importowy wewnętrznej błony - TIM23, rozpoznający presekwencje (Mokranjac i in., 2008; Cavalier-Smith, 2009; Sickmann i in., 2003).



Rys 2.1

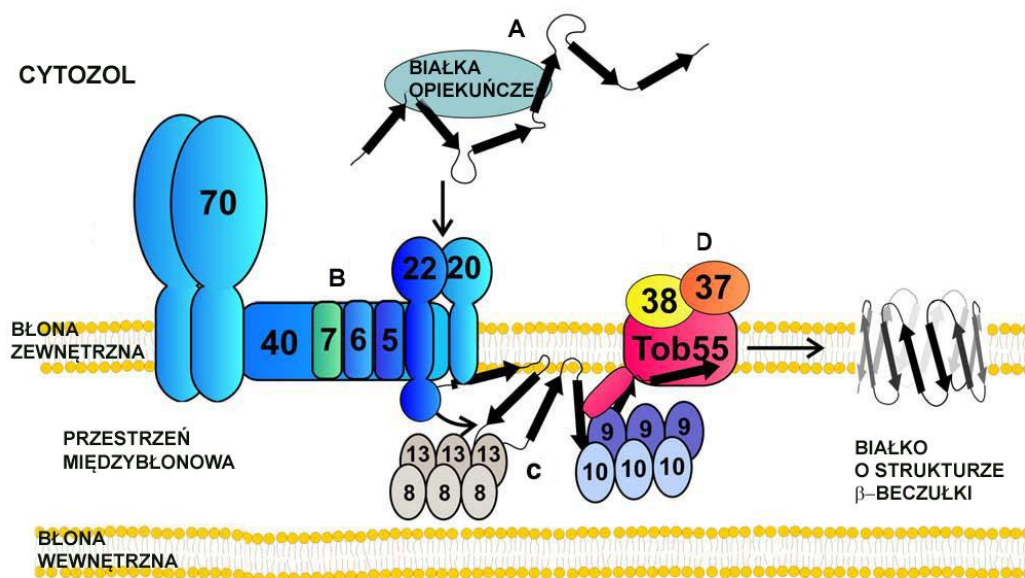
Szlaki transportu białek: w mitochondriach (A) i proteobakteriach (B). Większość mitochondrialnych prekursorów białkowych jest początkowo kierowana do kompleksu TOM. Następnie są przenoszone do kompleksu TOB/SAM w celu wbudowania w błonę zewnętrzną, do kompleksu TIM22 w celu wbudowania w błonę wewnętrzną, do kompleksu MIA w celu wprowadzenia w przestrzeń międzybłonową i do kompleksu TIM23 w przypadku importu do matryks. Kompleks TIM23 nazywany jest również kompleksem TIM23/PAM, gdzie PAM oznacza motor importowy, uznawany za integralną część kompleksu TIM23. W przypadku bakterii translokazy błony wewnętrznej - SEC i YidC - są odpowiedzialne za wbudowanie białek w tę błonę. Translokazy TAT, jak również SEC, eksportują prekursorów białkowych do przestrzeni peryplazmatycznej. Białka prekursorowe mogą być utleniane przez kompleks DsbA/B i integrowane z błoną zewnętrzną, z udziałem kompleksu BAM lub mogą być eksportowane na zewnątrz (według Kutik i in., 2009, zmodyfikowany według Thornton i in., 2010).

Białka nieposiadające presekwencji, również są kierowane do kompleksu TOM, skąd mogą być przekazywane do przestrzeni międzybłonowej przy udziale kompleksu MIA lub kierowane do białek opiekuńczych Tim. Białka Tim zapobiegają ich agregacji i kierują do kompleksu TIM22 lub kompleksu sortującego – składającego TOB/SAM,

znajdującego się w błonie zewnętrznej. Zarówno TIM22 jak i TOB/SAM wbudowują substraty w odpowiednie błony. Białka w większości są przenoszone przez kompleksy TOM i TIM w formie rozwiniętej, dopiero w docelowym przedziale ulegają zwinięciu w funkcjonalną formę (Mokranjac i in., 2008; Kutik i in., 2009). W wyniku procesu importu do obu błon mitochondrialnych kierowane są białka kluczowe dla transportu metabolitów przez te błony. W przypadku błony zewnętrznej jest to białko VDAC, natomiast transport metabolitów przez błonę wewnętrzną oparty jest głównie na systemie nośników mitochondrialnych.

2.3.1 Kompleksy importowe zewnętrznej błony mitochondrialnej

Błona zewnętrzna mitochondriów odgrywa kluczową rolę w komunikacji z cytoplazmą, wymianie metabolitów, imporcie białek i utrzymywaniu odpowiedniej morfologii (Becker i in., 2009). Wszystkie znane białka zewnętrznej błony mitochondrialnej są kodowane przez genom jądrowy, w tym białka o strukturze beczułki β , które są charakterystycznym elementem błony zewnętrznej organelli eukariotycznych pochodzenia endosymbiotycznego, jak i bakterii gram – ujemnych (Walter i Rapaport, 2009). Podczas gdy większość białek zakotwiczona jest w błonie domeną o strukturze helisy α , beczułki β formują strukturę cylindryczną ukształtowaną przez co najmniej kilka antyrównoległych harmonijek β , krótkie zwroty β i dłuższe pętle.



Rys.2.2

Model organizacji kompleksów importowych zewnętrznej błony mitochondrialnej i importu białek o strukturze beczułki β na podstawie ustaleń dotyczących mitochondriów *S. cerevisiae*. Nowo zsyntezowane białka wiążą się w cytoplazmie z białkami opiekuńczymi (A), następnie są rozpoznawane przez receptory kompleksu TOM (B) i importowane do kompleksu TOB/SAM z udziałem małych białek Tim (C), w celu wbudowania w błonę zewnętrzną (D). (Według Walther i Rapaport, 2009).

W mitochondriach drożdży *S. cerevisiae* tylko sześć białek zlokalizowanych w błonie zewnętrznej ma zachowaną strukturę beczułki β : Tom40, Tob55/Sam50, Mmm2, Mdm10 oraz VDAC1 i VDAC2 (Walther i Rapaport, 2009). Jednakże w mitochondriach innych eukariontów do tej pory zidentyfikowano tylko trzy kategorie białek tworzących strukturę beczułki β : Tom40, Tob55/Sam50 i izoformy białka VDAC (Paschen i in., 2005; Dolezal i in., 2006; Zeth, 2010). Wszystkie te białka zdolne są do tworzenia kanałów, które funkcjonują w obrębie kompleksów z innymi białkami, przy czym białko VDAC tworzy kanał jako monomer, podczas gdy kanały tworzone przez Tom40 i Tob55 są prawdopodobnie strukturami oligomerycznymi (Rapaport, 2005). Co ciekawe, skład podjednostkowy kompleksów TOB/SAM i TOM, w obrębie których występują białka Tob55/Sam50 i Tom40 może być różny u przedstawicieli różnych linii rozwojowych organizmów eukariotycznych, ale Tob55/Sam50 i Tom40 są kluczowe dla funkcjonowania tych kompleksów, niezależnie od analizowanego organizmu (Dolezal i in., 2006; Perry i in., 2008).

Budowa i funkcje translokazy błony zewnętrznej – kompleks TOM

Kompleks TOM (translokaza błony zewnętrznej) bierze udział w rozpoznawaniu, sortowaniu i translokacji importowanych białek (np. Bohnert i in., 2007; Neupert i Herrmann, 2007). W sensie strukturalnym kompleks TOM stanowi połączenie podjednostek o zróżnicowanej stechiometrii i funkcji. Nazwy tych podjednostek utworzone są ze skrótu Tom i liczby odpowiadającej przybliżonej masie cząsteczkowej, a liczba ich typów w opisanych dotąd kompleksach izolowanych z różnych źródeł jest zmienna. Do najlepiej poznanych należy kompleks TOM wyizolowany z mitochondriów drożdży *S. cerevisiae* składający się z 7 podjednostek (np. Kutik i in., 2009). Wyróżnia się dwie formy kompleksu TOM: tzw. rdzeń kompleksu TOM i integralny kompleks TOM (z ang. TOM holo-complex). Rdzeń kompleksu TOM ma masę cząsteczkową 450–500 kDa i w jego skład wchodzi Tom40, Tom22 i trzy małe białka Tom - Tom5, Tom6 i Tom7. Integralny kompleks TOM dodatkowo zawiera białka Tom20 i Tom70, pełniące funkcje receptorów, a jego masa cząsteczkowa waha się w granicach 490–600 kDa (Walther i Rapaport, 2009). Należy jednak zauważyć, iż białko Tom70 nie występuje w kompleksach TOM różnych organizmów, a białko Tom22 może występować w formie skróconej, jako tzw. Tom8 (np. Dolezal i in., 2006; Perry i in., 2008)

Podstawowym zadaniem białka Tom40 w obrębie kompleksu TOM jest tworzenie kanału importowego. Białko Tom40 poddane nadekspresji lub izolowane z kompleksu jest zdolne do samodzielnego tworzenia kanału (Hill i in., 1998; Ahting i in., 2001). Jednak podstawowa charakterystyka elektrofizjologiczna kanału utworzonego samodzielnie przez białko Tom40 nie jest identyczna z charakterystyką aktywności

kanałowej kompleksu TOM (Ahting i in., 2001; Hill i in., 1998; Kuenkele i in. 1998). Co więcej, w obrębie kompleksu TOM lokalizuje się dwa a nawet trzy kanały tworzone przez Tom40 (Rehling i in., 2003). Wynika to prawdopodobnie z braku innych białek Tom, które w kompleksie działają modulująco.

Białko Tom40 dominuje ilościowo w kompleksie TOM (6-8 cząsteczek), przy czym do tej pory nie udało się ustalić, czy kanały importowe tworzone są przez poszczególne beczałki β czy też powstają między kilkoma beczałkami, przyjmującymi w kompleksie odpowiednie ustawienie (Walther i Rapaport, 2009). Dla powstania kanałów importowych istotne znaczenie mają również białko Tom22, a w szczególności jego domena transbłonowa oraz małe białka Tom: Tom5, Tom6, Tom7 (Becker i in., 2009; Stojanovski i in., 2007). Białka Tom22 i Tom6 są istotne dla stabilizacji struktury kanału importowego. Ich brak prowadzi do powstania kompleksów o niższej masie cząsteczkowej (100 kDa), w skład których wchodzi dimery białka Tom40 oraz małe białka Tom (Paschen i in., 2005). Oddziaływania Tom40-odcinki transbłonowe Tom22 wymagają funkcjonalnego białka Tom5, wspomagającego wprowadzenie presekwencji w kanał. Białko Tom6 pełni rolę stabilizatora kanału importowego, zaś Tom7 odpowiada za destabilizację oddziaływań między Tom40 a podjednostkami pełniącymi funkcję receptorów (Walther i Rapaport, 2009). Brak Tom7 wzmacnia oddziaływania pomiędzy Tom20-Tom22-Tom40, co utrudnia uwalnianie translokowanego białka do błony (Hönlinger i in., 1996). Co ciekawe, białko Tom7 jest także specyficznym regulatorem aktywności kompleksu TOB/SAM (Meisinger i in., 2006). Istotnym elementem, regulującym działanie kanału importowego, jest obecność białek receptorowych Tom20 i Tom70. Kompleks TOM jest zdolny do translokacji przy braku tych białek, jednakże zachodzi ona zdecydowanie wolniej (Suzuki i in., 2002). Należy także zauważyć, że kanały w obrębie kompleksu TOM mogą zostać wykorzystane do transportu metabolitów w warunkach ograniczonej przepuszczalności lub braku kanału VDAC w mitochondriach (Antos i in., 2001; Budzińska i in., 2009).

Budowa i funkcje kompleksu TOB/SAM

Funkcją kompleksu TOB/SAM (topogeneza białek zewnętrznej błony mitochondrialnej tworzących strukturę beczałki β /maszyna sortowania i składania białek) jest sortowanie i składanie białek w funkcjonalne kompleksy. Przez dłuższy czas kompleks TOB/SAM identyfikowany był tylko z funkcją wbudowywania w błonę zewnętrzną mitochondriów białek o strukturze beczałki β (Habib i in., 2006; Bohnert i in., 2007). Najnowsze badania wskazują jednak, że kompleks ten jest także niezbędny do importu podjednostek kompleksu TOM, tworzących strukturę helisy α (Thornton i in.,

2010). Kompleks TOB/SAM stanowi zatem elastyczną platformę umożliwiającą integrowanie różnych szlaków importu, co ułatwia wbudowywanie białek w kompleks TOM, przy czym w procesie tym kompleks TOB/SAM może oddziaływać z różnymi białkami (Thornton i in., 2010).

U drożdży *S. cerevisiae* w kompleksie TOB/SAM występują trzy białka (patrz rys. 2.2): Tob55 (Sam50/Omp85), Tob38 (Sam35/Tom38) i Mas37 (Sam37/Tom37; Walter i Rapaport, 2009). Białko Tob55 jest integralnym białkiem błonowym. Wyróżnia się w nim dwie domeny: zlokalizowaną w błonie, która tworzy strukturę beczułki β , zdolną do tworzenia kanału i hydrofilową, skierowaną do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (Paschen i in., 2005; Thornton i in., 2010). Mas37 i Tob38 są białkami peryferyjnymi, oddziałującymi z białkiem Tob55 od strony cytoplazmy (Thornton i in., 2010). Brak podjednostki Tob38 prowadzi do problemów związanych z wbudowywaniem beczulek β , podobnie jak w przypadku braku Tob55. Białko Mas37 uczestniczy prawdopodobnie w uwalnianiu importowanych białek z kompleksu TOB/SAM, co umożliwia ich wprowadzenie w strukturę błony lub warunkuje oddziaływanie z innymi białkami (Habib i in., 2005). Z kolei białko Tob38 warunkuje powstanie kompleksu TOB/SAM, jak również jego stabilność (Milenkovic i in., 2004).

Białko Tob55, główny składnik kompleksu TOB/SAM, jest jedynym mitochondrialnym białkiem tworzącym strukturę beczułki β , w przypadku którego stwierdzono homologię z białkami bakteryjnymi (Dolezal i in., 2006). Białka te zaliczane są do rodziny Omp85 (ang. outer membrane porin). Obecność Tob55 stwierdzono w mitochondriach praktycznie wszystkich organizmów eukariotycznych. Obecność białka Tob38 stwierdzono tylko w mitochondriach grzybów, przy czym sugeruje się, że może być ono odpowiednikiem metaksyny 2, białka zlokalizowanego w mitochondriach zwierząt. Z kolei białko Mas37 wykazuje ograniczone podobieństwo sekwencji aminokwasowej do metaksyny 1, białka zlokalizowanego w mitochondriach zwierząt i roślin (Kozjak-Pavlovic i in., 2007). Białko Tob55 może tworzyć w obrębie kompleksu TOB/SAM kanał o średnicy 4 - 5 nm, przy całkowitej jego średnicy 15 nm (Walther i Rapaport, 2009). Białko jest zdolne do insercji w dwuwarstwę lipidową i tworzenia kanału o średniej wartości przewodnictwa 3,7 nS (w obecności 1 M KCl). Kanał ten wykazuje również symetryczną zależność od potencjału, przy czym zamyka się przy wartościach potencjału wyższych niż 70 mV (Paschen i in., 2003).

Z kompleksem TOB/SAM oddziałuje kilka innych białek. W przypadku *S. cerevisiae* stwierdzono oddziaływanie tego kompleksu z białkiem Mdm10 (morfologia i dystrybucja mitochondriów), przy czym homologów tego białka nie udało się do tej pory znaleźć poza grzybami. Mdm10 jest integralnym białkiem błonowym, posiadającym zdolność tworzenia struktury beczułki β . Odpowiada ono prawdopodobnie za

prawidłowe rozmieszczenie i morfologię mitochondriów, a równocześnie oddziałując z kompleksem TOB/SAM uczestniczy w składaniu kompleksu TOM (Habib i in., 2006; Thornton i in., 2010). W przypadku komórek *S. cerevisiae* brak białka Mdm10 upośledza zarówno morfologię mitochondriów, jak i powstanie kompleksu TOM (Pfanner i in., 2004). Innym białkiem oddziałującym z kompleksem TOB/SAM jest Mim1 (mitochondrialny import). Zakotwiczone jest w zewnętrznej błonie mitochondriów za pomocą odcinka o strukturze helisy α . Bierze udział w składaniu kompleksu TOM, a jego brak obniża powinowactwo TOB/SAM względem Tom40. Z kolei oddziaływanie kompleksu TOB/SAM z białkami Tom5/Tom40 prowadzi do wiązania prekursora Tom6 i jego wbudowywania w kompleks TOM (Thornton i in., 2008). Wśród białek współdziałających z kompleksem TOB/SAM są również Tom7 i małe białka Tim (translokaza wewnętrznej błony mitochondriów). Białko Tom7 sprzyja odłączeniu białka Mdm10 od kompleksu TOB/SAM, co utrudnia powstawanie funkcjonalnego kompleksu TOM, ale jednocześnie odsłania na kompleksie TOB/SAM miejsca istotne dla wbudowania w błonę białka VDAC (Meisinger i in., 2006). Białko Tom7 pełni zatem funkcję specyficznego regulatora aktywności kompleksu TOB/SAM. Współdziałanie kompleksów małych białek Tim z kompleksem TOB/SAM polega prawdopodobnie na osłanianiu odcinków hydrofobowych białek tworzących strukturę beczułki β po ich uwolnieniu z kompleksu TOM, co z kolei ułatwia utrzymywanie importowanego białka w stanie konformacyjnym, pozwalającym na jego oddziaływanie z kompleksem TOB/SAM i następnie wbudowanie w błonę (Hoppins i Nargang, 2004).

2.3.2 Budowa i funkcje kanału VDAC

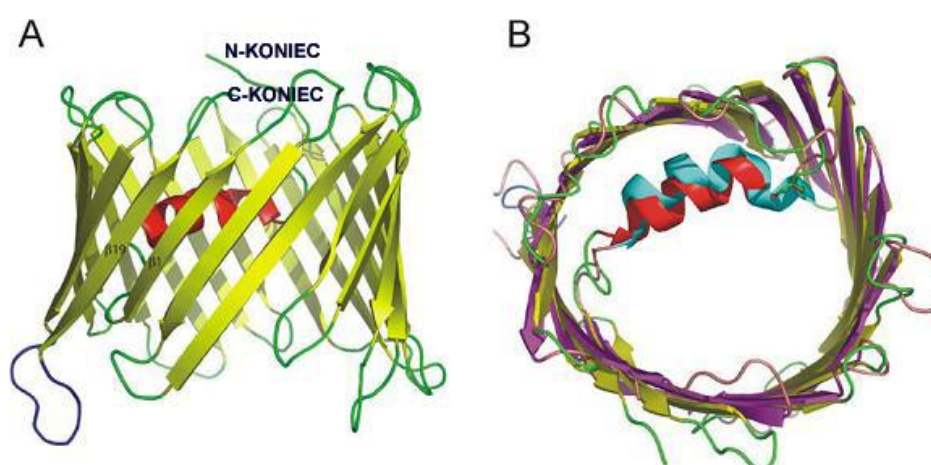
Kanał VDAC (ang. Voltage Dependent Anion Channel), czyli zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej, zwany również poryną mitochondrialną, jest najliczniej wstępującym białkiem zewnętrznej błony mitochondrialnej (Colombini, 2004). Stanowi około 0,4% białek mitochondrialnych (Shoshan-Barmatz i in., 2010). Został zidentyfikowany w 1976 roku (Schein i in., 1976) i od tej pory jest obiektem badań. Dostępne dane wskazują, że VDAC odgrywa znaczącą rolę w licznych procesach komórkowych, w tym homeostazie wapniowej i egzekucji apoptozy, zachodzącej drogą mitochondrialną. Stanowi główną drogę wymiany metabolitów między cytoplazmą a mitochondrium, co jest niezbędne do właściwego funkcjonowania mitochondriów i w konsekwencji całej komórki (Shoshan-Barmatz i in., 2009). Kanał VDAC jest także miejscem uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy (Han i in., 2003). Kanał VDAC oddziałuje

z translokazą nukleotydów adeninowych (ANT), białkiem prowadzącym transport ATP i ADP przez błonę wewnętrzną mitochondriów. VDAC i ANT tworzą łącznie system transportu nukleotydów adeninowych, a istotną rolę w działaniu tego systemu odgrywa oddziaływanie kanału VDAC z kinazami (np. heksokinaza, kinaza kreatynowa, kinaza glicerolowa), dzięki czemu enzymy te mają ułatwiony dostęp do ATP (Shoshan-Barmatz i in., 2009; Poletti i in., 2009). Kinazy przekształcają eksportowany ATP do ADP, który może szybko powrócić do matryks mitochondrialnej, a następnie ulec fosforylacji oksydacyjnej. Co więcej, kanał VDAC i/lub jego oddziaływanie z różnymi białkami uznaje się za kluczowy czynnik, regulujący aktywność kanału PTP (kanał o wysokiej przewodności, z ang. permeability transition pore), nazywany również megakanalem mitochondrialnym. Kanał ten otwiera się w odpowiedzi na czynniki proapoptyczne, co prowadzi do zmian w przepuszczalności błon mitochondrialnych, umożliwiającą uwolnienie białek proapoptycznych z mitochondriów, co prowadzi do egzekucji apoptozy. Zatem włączenie kanału VDAC w funkcjonowanie kanału PTP ma istotne znaczenie dla uruchomienia apoptozy, zachodzącej drogą mitochondrialną, przy czym należy zauważyć, że istnieją dane eksperymentalne wskazujące na brak udziału VDAC w aktywności i/lub regulacji kanału PTP (np. Shoshan-Barmatz i in., 2010). Równocześnie trwa dyskusja, dotycząca innych białek kluczowych dla działania kanału PTP.

Potwierdzona eksperymentalnie kluczowa rola kanału VDAC w funkcjonowaniu mitochondriów sprawia, iż kanał ten coraz częściej wskazywany jest jako istotne miejsce etiologii i zarazem terapii szeregu ludzkich chorób (Shoshan-Barmatz i in., 2010). Stwierdzono na przykład, iż proces apoptozy zachodzącej drogą mitochondrialną ma podstawowe znaczenie w patofizjologii ataku serca, udaru, nowotworów, mitochondrialnych encefalopatii oraz chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimerera i stwardnienie boczne zanikowe (Alexander i in., 2007; McEnery i in., 1992; Olson i Kornbluth, 2001; Tatton i Olanow, 1999). Stąd próby wykorzystania tego białka, jako miejsca uchwytu farmakologicznego w terapii tych chorób. Stwierdzono na przykład, że erastyna, która wiąże się z kanałem VDAC wyłącznie w komórkach zawierających onkogen RAS, zmienia przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej, przez co wpływa na zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu, powodując śmierć komórek wywołaną stresem oksydacyjnym (Yagoda i in., 2007).

Masa cząsteczkowa białka VDAC izolowanego z mitochondriów różnych organizmów wynosi około 30 kDa (Benz i in., 1994; Blachly-Dyson i Forte, 2001; Colombini, 2004; Shoshan-Barmatz i in., 2006). W mitochondriach kręgowców, powszechnie występują trzy jego izoformy (VDAC1, VDAC2, VDAC3), podczas gdy u

innych organizmów eukariotycznych liczba izoform jest zmienna (Saccone i in., 2003; Young i in., 2007). *Neurospora crassa* posiada tylko jedną izoformę, a *Saccharomyces cerevisiae* dwie, które są prawdopodobnie pozostałością po duplikacji genomu (Shoshan-Barmatz i in., 2010). Co więcej, duplikacje sekwencji kodujących białko VDAC, zachodzące w toku ewolucji niezależnie w obrębie różnych linii rozwojowych, uznaje się za przyczynę obecnie występujących u różnych organizmów izoform białka VDAC (Sampson i in., 1996; Saccone i in., 2003; Young i in., 2007). Ponieważ sekwencja aminokwasowa białka VDAC wykazuje wysoki poziom konserwatywności uważa się, iż struktura przestrzenna tego białka, kluczowa dla jego funkcji kanałowych, jest w zasadzie identyczna u wszystkich eukariontów (Colombini, 2004).



Rys. 2.3

Struktura przestrzenna izoformy VDAC1 wyznaczona na podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego, krystalografii rentgenowskiej i połączenia obu tych technik. (A) Beczka β utworzona z 19 odcinków o strukturze harmonijki β . Odcinek o strukturze helisy α znajduje się w jej wnętrzu. (B) Nałożenie struktur przestrzennych VDAC1 człowieka i myszy. Odcinek o strukturze helisy α został zaznaczony kolorem czerwonym w białku ludzkim i niebieskim w białku mysim (według Shoshan-Barmatz i in., 2010).

Po wielu latach dyskusji dotyczącej struktury przestrzennej białka VDAC opartej na modelach komputerowych, w roku 2008 udało się wyznaczyć strukturę tego białka z rozdzielczością na poziomie atomowym przy wykorzystaniu spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego, krystalografii rentgenowskiej i połączenia obu tych technik (Hiller i in., 2008; Ujwal i in., 2008; Bayrhuber i in., 2008). Analizie poddano izoformę VDAC1 z mitochondriów człowieka i myszy. Stwierdzono, że w obrębie białka występuje 19 odcinków o strukturze harmonijki β , tworzących strukturę beczki β , w obrębie której zlokalizowany jest odcinek o strukturze helisy α (rys. 2.3). Na jeden odcinek o strukturze harmonijki β przypada średnio 10 reszt aminokwasowych, a

najdłuższa pętla łącząca występuje między odcinkami 18 i 19 i składa się z ośmiu reszt aminokwasowych: GKNVNAGG. Hydrofilowe wnętrze beczułki wypełnia por o średnicy około 2,5-3 nm. Z kolei odcinek o strukturze helisy α , lokalizowany we wnętrzu beczułki, w zależności od istniejącego potencjału zmienia swoje położenie, pełniąc prawdopodobnie funkcję czujnika potencjału (Song i in., 1998; Shoshan-Barmatz i in., 2010).

2.4 Komunikacja między jądrem komórkowym i mitochondriami

W toku ewolucji komórki eukariotyczne nabyły mitochondria. Jednak większość genów organellowych została utracona lub przeniesiona do jądra komórkowego, które zaczęło sprawować kontrolę nad ekspresją białek importowanych do mitochondrium. Z kolei mitochondria wytwarzają sygnały kierowane do jądra komórkowego, informujące o ich aktualnym stanie, co umożliwia skoordynowane działania jądra komórkowego i mitochondriów (Woodson i Chory, 2008).

2.4.1 Rola reaktywnych form tlenu w komunikacji między jądrem i mitochondriami

Ścisła koordynacja między jądrem i mitochondriami jest wymagana do właściwego funkcjonowania komórki. Koordynacja ta wykorzystuje dwa typy sygnałów: sygnały anterogradowe (powstające w jądrze komórkowym i kierowane do mitochondriów) i retrogradowe (powstające w mitochondriach i kierowane do jądra komórkowego) (np. Allen, 2003; Butow i Avadhani, 2004; Pesaresi i in., 2007; Woodson i Chory, 2008). Zatem, mechanizmy anterogradowe koordynują ekspresję genów w mitochondriach, w odpowiedzi na czynniki endogenne i środowiskowe, docierające do jądra komórkowego, podczas gdy mechanizmy retrogradowe odpowiedzialne są za przekazanie do jądra komórkowego sygnałów powstających w mitochondriach, co z kolei może modyfikować mechanizmy anterogradowe (rys. 2.4). Czynniki środowiskowe takie jak składniki odżywcze, dostęp światła czy obecność tlenu wpływają na ekspresję genów jądrowych, kodujących białka mitochondrialne, co z kolei wpływa na funkcjonowanie i ekspresję genów w tych organellach. Dostępność białek mitochondrialnych, kodowanych przez geny jądrowe, jest sprawnie regulowana na etapie transkrypcji, modyfikacji potranslacyjnych, importu, regulacji aktywności i składania w kompleksy (Woodson i Chory, 2008). Mitochondria mogą także odczytywać niektóre bodźce środowiskowe, po czym przekazują informację o działających

bodźcach i stanie funkcjonalnym do jądra, co prowadzi do regulacji genów jądrowych i regulacji metabolizmu komórkowego (Allen, 2003; Butow i Avadhani, 2004; Pesaresi i in., 2007; Woodson i Chory, 2008; Cannino i in., 2007).

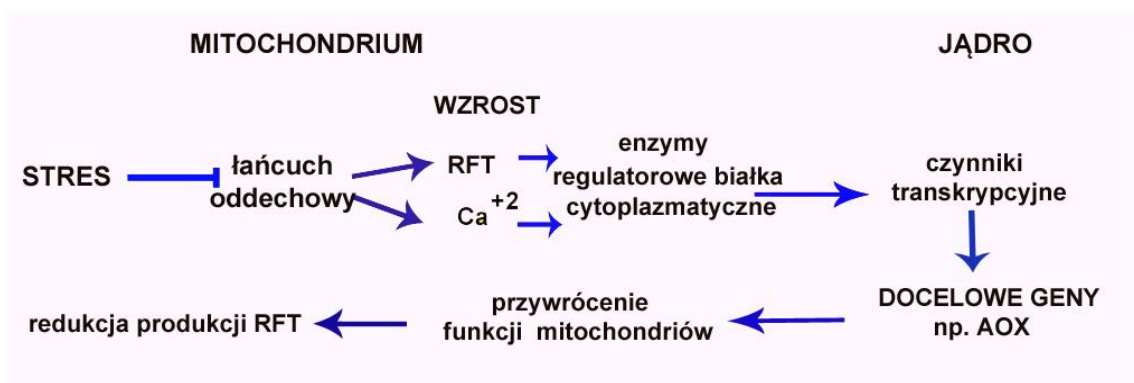


Rys. 2.4

Ogólny schemat komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami (według Woodson i Chory, 2008)

Sygnały retrogradowe mogą obejmować reaktywne formy tlenu (RFT), powszechnie produkowane i uwalniane przez mitochondria. Ponieważ mitochondria w toku ewolucji utraciły zdolność sekrecji białek do cytoplazmy (Herrmann, 2003), właśnie powszechny charakter uwalniania RFT przez mitochondria sprawia, że tym cząsteczkom przypisuje się ważną rolę w komunikacji między mitochondriami i jądrem komórkowym (Jo i in., 2001; Łukasiewicz-Hussain, 2003). Co więcej, RFT uwalniane przez mitochondria uznaje się za istotny czynnik determinacji wewnątrzkomórkowych stanów oksydacyjno-redukcyjnych (redoks) i regulacji kaskad sygnalizacyjnych (Finkel, 2003; Han i in., 2003; Liu i in., 2005; Storz, 2006; Budzinska i in., 2007). Dostępne dane wskazują, że RFT pozwalają mitochondriom „poinformować” jądro komórkowe o warunkach determinujących ich funkcjonowanie, co z kolei umożliwia przystosowanie komórki do istniejących warunków (Woodson i Chory, 2008). Działanie RFT, jako sygnałów retrogradowych badano po raz pierwszy wykorzystując drożdże *S. cerevisiae*. Stwierdzono między innymi, że jednym z czynników uruchamiających uwalnianie RFT jest dysfunkcja mitochondriów. Później stwierdzono, iż upośledzenie działania mitochondrialnego łańcucha oddechowego jest czynnikiem uruchamiającym zmiany na poziomie transkrypcji u różnych gatunków (Woodson i Chory, 2008). Jak pokazano na rys. 2.5., w sygnalizacyjnym działaniu RFT pośredniczą czynniki transkrypcyjne i regulatorowe białka cytoplazmatyczne. Równocześnie odpowiedź komórki może mieć

bardzo różny charakter, od regulacji ekspresji oksydazy alternatywnej (komórki roślin) i usunięcia dysfunkcji mitochondriów do modulacji starzenia się komórek drożdży i transformacji nowotworowej w przypadku komórek zwierząt.



Rys. 2.5

Przykład szlaku sygnalizacyjnego uruchamianego przez RFT uwalniane przez mitochondria w wyniku dysfunkcji łańcucha oddechowego (Według Woodson i Chory, 2008).

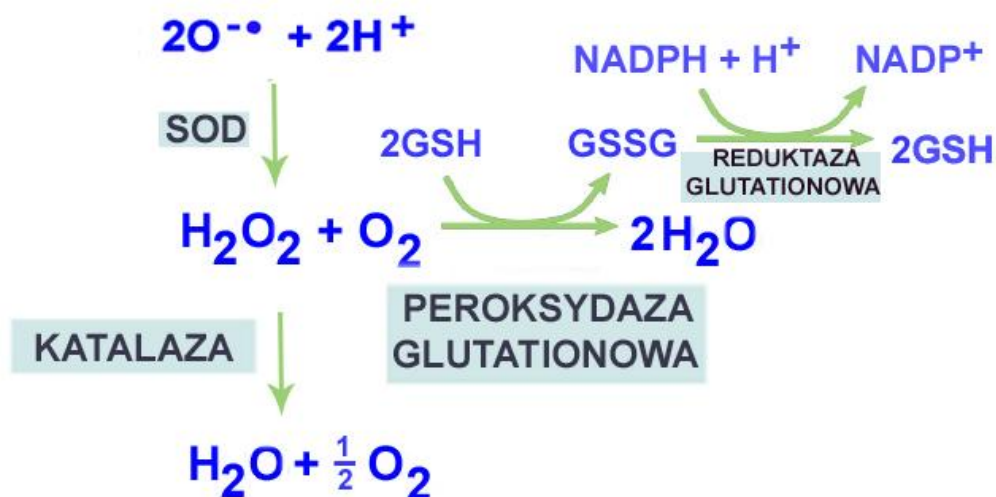
Co istotne, poziom uwalniania RFT z mitochondriów musi podlegać precyzyjnej kontroli. Kiedy uwalnianie RFT ominie lub pokona komórkowe mechanizmy obronne, może spowodować poważne uszkodzenia szeregu makrocząsteczek, w tym kwasów nukleinowych, białek i lipidów, co w konsekwencji prowadzi do dysfunkcji komórki i/lub jej śmierci (Madesh i Hajnoczky, 2001; Duchen, 2004; Storz, 2006; Monsalve i in., 2007; Mammucari i Rizutto, 2010). Liczne badania dostarczają dowodów na to, iż szkodliwe działanie RFT wzrasta wraz z wiekiem, jako rezultat zakłóconej równowagi redoks oraz akumulacji uszkodzeń (Choksi i Papaconstantinou, 2008; Rebrin i Sohal, 2008). Wiadomo na przykład, że RFT, powodując mutacje w mitochondrialnym DNA, wpływają szkodliwie na funkcje łańcucha transportu elektronów, wywołując tym samym wzrost generacji RFT i nagromadzenie zniszczeń w obrębie komórki. Z drugiej strony, śmierć komórki może być skutkiem uruchomienia przez RFT określonych kaskad sygnalizacyjnych. Na przykład, występujące powszechnie w komórkach białko p66Shc, w normalnych warunkach nie przyczynia się do produkcji RFT. Stres oksydacyjny może aktywować kaskadę sygnalizacyjną, w której białko p66Shc – w wyniku fosforylacji przez kinazę PKC β – przemieszcza się z cytoplazmy do mitochondriów, gdzie dodatkowo potęguje produkcję RFT, co prowadzi do apoptozy (Mammucari i Rizutto, 2010; Lebedzinska i in., 2009).

2.4.2 Ochrona antyoksydacyjna

Jak wspomniano wcześniej, (patrz Wstęp, p. 2.4.1) nadmierna produkcja RFT jest bardzo szkodliwa i – w przypadku organizmu człowieka – może odpowiadać za rozwój wielu schorzeń, np. nowotworów, choroby Alzheimera i Parkinsona (Turzyńska i in., 2005; Butterfield i in., 2006). Dlatego każdy organizm posiada system obrony przed RFT oparty między innymi na działaniu enzymów antyoksydacyjnych (rys. 2.6). Najpowszechniej występującymi formami RFT uwalnianymi z mitochondriów są anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2), będący produktem dysmutacji $O_2^{\cdot-}$. (Han i in., 2001; Jezek i Hlavata, 2005). Podstawową ochronę przeciwko $O_2^{\cdot-}$ w komórkach eukariotycznych stanowi dysmutaza ponadtlenkowa (SOD). W zależności od lokalizacji enzym ten może zawierać jony manganu (MnSOD/SOD2 w przypadku występowania w matriks mitochondrialnej) lub jony cynku i miedzi (CuZnSOD/SOD1 w przypadku lokalizacji w cytozolu, przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, jak również jądrze, lizosomach i peroksysomach (Gałęcka i in., 2008; Storz 2006; Culotta i in., 2006; Jezek i in., 2005). Obie formy SOD katalizują reakcję dysmutacji $O_2^{\cdot-}$ w H_2O_2 , który może zostać przekształcony w wodę przez inne enzymy antyoksydacyjne, lub rodnik hydroksylowy w obecności metali (Stohs i in., 1995). CuZnSOD jest również zdolna katalizować nitrowanie tyrozyny w białkach (Beckman, 1996) i posiada aktywność peroksydazy (Potter i in., 2003) i oksydazy tiolowej (Winterbourn i in., 2002). W ten sposób obie dysmutazy wykazują właściwości ochronne i pro-oksydacyjne, a nadmiar bądź brak aktywności tych enzymów może być elementem etiologii chorób (Lushchak i in., 2006).

Ważnym elementem antyoksydacyjnego układu enzymatycznego są peroksydazy glutationowe. W wyniku działania peroksydazy glutationowej H_2O_2 zostaje przekształcony w H_2O . U drożdży *S. cerevisiae* występują trzy peroksydazy glutationowe, jednak w ich centrum aktywnym zamiast selenocysteiny, jak w przypadku peroksydaz glutationowych ssaków, występuje tylko cysteina, co sprawia, że są one mniej aktywne niż peroksydazy glutationowe ssaków (Bartosz, 2003). Innym enzymem antyoksydacyjnym jest reduktaza glutationowa (GR), występująca w cytozolu i mitochondriach. Umożliwia ona odtworzenie zredukowanego glutationu (GSH), który pełni rolę kofaktora peroksydazy glutationowej oraz antyutleniacza i zmiatacza RFT (Jo i in., 2001). Reduktaza glutationowa jest flawoproteiną, która jako czynnik redukujący wykorzystuje NADPH. GR uczestniczy również w przemianach detoksyfikujących tlen. Na jej udział w mechanizmach antyoksydacyjnych wskazuje także wzrost ekspresji, towarzyszący ekspozycji na czynniki prowadzące do stresu oksydacyjnego (Gałęcka i in., 2008). W enzymatycznej obronie komórek przed wolnymi rodnikami uczestniczy

również katalaza, zlokalizowana w cytozolu. Przeprowadza ona reakcję dysproporcjonowania H_2O_2 , która prowadzi do powstania tlenu cząsteczkowego i wody (Ścibor i Czeczot, 2006). Zmiany w aktywności opisanych wyżej enzymów, jak i w proporcji glutationu zredukowanego do powstającego w wyniku jego utleniania disulfidu glutationu (GSH/GSSG) mogą być zatem stosowane jako wskaźnik poziomu produkcji RFT przez mitochondria (Jo i in., 2001; Wojtczak i Slyshenkov, 2003).



Rys. 2.6

Aktywność podstawowych enzymów antyoksydacyjnych (Według Bartosz, 2004).

Podsumowując, prawidłowe funkcjonowanie komórki wymaga skutecznej komunikacji między jądrem komórkowym, a pozostałymi organellami, m. in. mitochondriami. Dlatego tak istotne jest poznanie mechanizmów odpowiadających za zmiany w poziomie ekspresji i aktywności białek mitochondrialnych (Woodson i Chory, 2008). Właściwa koordynacja procesów zachodzących w komórce gwarantuje prawidłowe jej funkcjonowanie i zapobiega powstaniu wielu schorzeń, w tym nowotworów (Lai i in., 2005; Herber i in., 2010).

3 Cel pracy

Ponieważ większość białek mitochondrialnych kodowana jest przez geny jądrowe, oczywistym jest istnienie skutecznej komunikacji między mitochondriami i jądrem komórkowym, umożliwiającej dostosowanie funkcjonowania mitochondriów do aktualnie istniejących warunków, które wynikać mogą między innymi z procesów zachodzących w samych mitochondriach. Przykładem takiej komunikacji, obserwowanym u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest zwiększenie ekspresji składników kompleksu TOM (białek Tom) w warunkach braku funkcjonalnych genów kodujących izoformy białka VDAC (mutanty $\Delta por1$ i $\Delta por2$), szczególnie VDAC1, tworzącej kanał, co zwiększa przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej dla metabolitów. Jednak natura sygnału zapoczątkowującego zmianę ekspresji genów jądrowych kodujących białka mitochondrialne i generowanego przez mitochondria jest w zasadzie nadal nieznana. Dostępne dane wskazują, że w komunikacji między mitochondriami a jądrem komórkowym uczestniczyć mogą reaktywne formy tlenu (RFT), co pozostaje w zgodzie z powszechnym charakterem generacji tych cząsteczek przez mitochondria. Zatem, w ramach niniejszej pracy przedmiotem badań był szczep dziki oraz mutanty $\Delta por1$ i $\Delta por2$ *S. cerevisiae* i sformułowano następujące cele badawcze:

1. określenie wpływu obecności izoform białka VDAC na wartości wewnątrzkomórkowych stanów oksydacyjno-redukcyjnych (redoks)
2. zbadanie wpływu wewnątrzkomórkowych stanów redoks na poziom ekspresji i aktywności mitochondrialnych i cytoplazmatycznych enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom ekspresji białek kanałowych zewnętrznej błony mitochondrialnej, wchodzących w skład kompleksów aparatu importu białka (Tom40 i Tob55/Sam50), a także przebieg importu białka do mitochondriów
3. wyznaczenie relacji między stanami redoks a poziomem uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego przez mitochondria
4. sprawdzenie, czy obecność izoform białka VDAC może być istotna dla ekspresji białek poprzez wpływ na poziom kodujących je mRNA, w tym białek Tom40 i Tob55/Sam50, enzymów antyoksydacyjnych, jądrowych czynników transkrypcyjnych uczestniczących w adaptacji do zmian stanów redoks i białek uczestniczących w komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami

4 Materiały

4.1 Materiał biologiczny

4.1.1 Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

Mutanty M22-2 i M3-2 oraz wyjściowy szczep dziki M3 (*MATa*, *lys2*, *his4*, *trp1*, *ade2*, *leu2*, *ura3*). Mutant M22-2 - oznaczany symbolem $\Delta por1$ - zawiera delecję w genie *POR1*, kodującym białko VDAC1, natomiast mutant M3-2 - oznaczany symbolem $\Delta por2$ - zawiera delecję w obrębie genu *POR2*, kodującym białko VDAC2 (Blachly-Dyson i in., 1997). Białko VDAC1 tworzy funkcjonalny kanał, podczas gdy funkcja białka VDAC2 jest dotychczas nieznana.

4.1.2 Bakterie *Escherichia coli*

a. DH5 α : *deoR*; *endA1*; *gyrA96*; *hsdR17*; (*rk-mk+*); *recA1*; *supE44*; *fhi-1*; $\Delta(\text{lacZYA-argFV169})$ $\phi 80 \delta \text{lacZ } \Delta \text{M15}$; F⁻, λ ⁻

b. szczep DH1, zawierający konstrukt plazmidowy pb₂(1-167) DHFR czyli gen białka chimerowego, składającego się ze 167 reszt aminokwasowych z końca aminowego drożdżowego cytochromu b₂, tworzących sekwencję kierującą białko do przestrzeni międzybłonowej, oraz mysiej reduktazy dihydrofolianu (DHFR) jako białka markerowego, w plazmidzie p-UHE do masowej ekspresji *in vivo*, indukowanej przez IPTG (Prof. W. Neupert, Monachium).

4.2 Konstrukty plazmidowe

Konstrukty powstałe na bazie wektora pGEM-T Easy, zawierające cDNA dla genów *TOB55* i *Su9* – *DHFR*, wprowadzone za miejscem promotorowym dla polimerazy SP6

4.3 Przeciwciała

- monoklonalne – skierowane przeciwko mysiej reduktazie dihydrofolianu (DHFR)
- poliklonalne – skierowane przeciwko białkom drożdży *S. cerevisiae*: Tom40, Tom70, Mge, Tob55, CuZnSOD, MnSOD

4.4 Pożywki

4.4.1 Pożywki do hodowli drożdżowej

YPD

Baktopepton - 2%

Ekstrakt drożdżowy - 1%

Glukoza - 2%

pH = 5,5

YPG

Baktopepton - 2%

Ekstrakt drożdżowy - 1%

Glicerol - 3%

pH = 5,5

W przypadku pożywek stałych dodawano 2% agar. Pożywki sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery

4.4.2 Pożywka do hodowli bakterii

LB (Luvia – Bertani)

Bakto-trypton - 1%

Ekstrakt drożdżowy - 0,5%

NaCl - 1%

pH = 7,0

W przypadku pożywek stałych dodawano 2% agar. Pożywki sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery.

4.5 Bufory do preparacji sferoplastów

Płyn I

Tris-SO₄ - 0,1 M

DTT - 10 mM

pH = 9,4

Płyn II

Sorbitol - 1,2 M

bufor fosforanowy - 20 mM

pH = 7,4

4.6 Bufory do izolacji mitochondriów

mannitol X: 0,65 M mannitol, 10 mM Tris-Cl pH = 7,4

mannitol A: mannitol X, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1% BSA, 1 mM PMSF

mannitol B: mannitol X, 0,2 mM EGTA, 0,1% BSA

mannitol C: mannitol X, 0,1% BSA

4.7 Bufory do elektroforezy, elektrotransferu i immunodetekcji białek

4.7.1 Bufor Lämmli

Tris-HCl - 60 mM

Glicerol - 25%,

β - merkaptoetanol - 14 mM,

Błękit bromofenolowy - 0,1%

SDS - 2%

pH = 7,4

4.7.2 Bufor SDS-PAGE

Glicyna - 0,19 M

Tris-HCl - 25 mM

SDS - 0,1 %

pH = 8,3

4.7.3 Bufor do barwienia żeli akrylamidowych

Błękit Coomasie - 1%

Metanol - 45%

Kwas octowy - 10%

4.7.4 Bufor do odbarwiania żeli akrylamidowych

Metanol - 10%

Kwas octowy - 10%

4.7.5 Bufor do elektrotransferu

Tris-HCl - 20 mM

Glicyna - 0,15 M

SDS - 0,02%

Metanol - 20%

pH = 8,8

4.7.6 Bufor TBS

Tris-HCl - 20 mM

NaCl - 150 mM

pH = 7,5

4.8 Bufory do importu białek do mitochondrium

4.8.1 Bufor do importu białka Tob55

Sacharoza - 250 mM
EDTA - 1 mM
KCl - 80 mM
MOPS - KOH - 10 mM
MgCl₂ - 5 mM
BSA - 3%
pH = 7,2

4.8.2 Bufor do importu białka Su9-DHFR

Mannitol - 0,6 M
Hepes - 50 mM
KCl - 50 mM
MgCl₂ - 10 mM
KH₂PO₄ - 2 mM
EDTA - 2,5 mM
BSA - 3%
pH = 6,9

4.8.3 Bufor do importu białka Pb₂-DHFR

Sacharoza - 250 mM
KCl - 20 mM
MOPS-KOH - 10 mM
MgCl₂ - 5 mM
BSA - 3%
Etanol - 20 mM
pH = 7,2

4.8.4 Bufor przemywający do importu Su9-DHFR

Mannitol - 0,6 M
Hepes - 50 mM
pH = 6,9

4.8.5 Bufor SM

Sacharoza - 250 mM

MOPS-KOH - 10 mM

pH = 7,2

4.9 Inne bufor

4.9.1 Bufory do oczyszczania białka pb₁₂-DHFR po nadekspresji

Bufor 1:

Sacharoza - 25%

Tris-HCl - 50 mM

pH = 8,0

Bufor 2:

Tris-HCl - 20 mM

EDTA - 1 mM

PMSF - 1 mM

Tryton X - 100 - 1%

DTT - 50mM

pH = 7,4

Bufor 3:

Tris-HCl - 20 mM

EDTA - 1 mM

PMSF - 1 mM

Tryton X - 100 - 0,1%

DTT - 50 mM

pH = 7,4

Bufor 4:

Tris-HCl - 20 mM

EDTA - 1 mM

PMSF - 1 mM

DTT - 50 mM

pH = 7,4

Bufor 5:

Mocznik - 7 M

Tris-HCl - 50 mM

DTT - 50 mM

pH = 7,4

4.9.2 Bufor M

Mannitol - 0,65 M

Hepes - 10 mM

Bufor fosforanowy - 10 mM

KCl - 5 mM

MgCl₂ - 4 mM

BSA - 0,2%

pH = 6,9

4.9.3 Bufor HS

Sacharoza - 250 mM

MOPS-KOH - 10 mM

KCl - 120 mM

pH = 7,2

4.9.4 Płyn do pomiaru uszkodzenia zewnętrznej błony mitochondrium i stopnia zużycia tlenu

Mannitol - 0,65 M

Hepes - 10 mM

KCl - 5mM

Bufor fosforanowy - 10 mM

MgCl₂ - 4 mM

BSA - 0,2%

pH = 6,9

4.9.5 Bufory do elektroforezy kwasów nukleinowych**TAE**

Tris-HCl - 40 mM

Kwas octowy - 0,1142%

EDTA - 1 mM

pH = 8,0

6 x SB

Błękit bromofenolowy - 0,25%

Błękit cyjanowy - 0,25%

Glicerol - 30%

4.10 Żele do elektroforezy**Żel akrylamidowy do elektroforezy białek**

	żel rozdzielający 14%	żel zagęszczający 5%
akrylamid/bisakrylamid	30%/0,8%	30%/0,8%
Tris/HCl pH = 8,8	0,25 M	-
Tris/HCl pH = 6,8	-	0,06 M
SDS	0,1%	0,1%
APS	0,05%	0,05%
TEMED	0,05%	0,05%

Żel agarozowy do rozdzielania kwasów nukleinowych

Bufor TAE

Agaroza 1%

Bromek etydyny - 0,2 µg/ml

4.11 Startery

NAZWA	SEKWENCJA	TEMPERATURA PRZYŁĄCZANIA STARTERA [°C]
YAP1F	5' CAATCGGTACCAGGAAATGAAAGC3'	57
YAP1R	5' CCTTCCTTAGATGGAACGACATCA3'	57
GPXF	5' CAAGAACCTGGCTCTGATGAAGA3'	57
GPXR	5' AACTTGTAACAGGGTCCTCATTG3'	57
MSN4F	5' AATTGGCGACTTCTGGTGTTGATA3'	57
MSN4R	5' GTTGATGATGTTGAGCTGCATGG3'	57
MSN2F	5' AGTGTCAACTCAACTGGCAATGGT3'	57
MSN2R	5' CTTCTGGACGGTGTTCATTGATTTTC3'	57
YAP2F	5' AGTGTATCGGGACCAAACCATGTT3'	57

YAP2R	5' TGCTTCAGATTGGGTTCGAATTGT3'	57
SKN7F	5' CAGCGACATCCATTGTCAGAAGTT3'	57
SKN7R	5' GTGTAAATCATCCCTCGTGAATGG3'	57
SIR2F	5' ATCACATTCTTTGGCGAAGCACT3'	57
SIR2R	5' GAACGTGGGAAGGAACCATGTT3'	57
HAP4F	5' AAGAGCAGGACTGTAACAATGGCA3'	57
HAP4R	5' TAGCGTTCGACTTCGACGTAGAAA3'	57
IF5A1F	5' TGGCTACTTGTCCCTTGATGACCA3'	57
IF5AR	5' TCTTCACCCATGGCAGAAATGATA3'	57
HAP1F	5' ACAAGGCTCAGACTTAGCATCCAA3'	57
HAP1R	5' AGGATCGTTGTATCCACCAACAAC3'	57
PUF3F	5' GTCCTGGAATTATCTGACTCCGT3'	57
PUF3R	5' TGGGTAGATAGATGGTAAATGTGG3'	57
RTG1F	5' AAGCCCAACAAGGGCCAAATTCT3'	57
RTG1R	5' TTGACAATGGTGCCTGTCTGCTT3'	57
RTG3F	5' CTGTCCCAAATGCTTTGATGAATG3'	57
RTG3R	5' CATAGTGCCAGCATGATTGTGGT3'	57
RTG2F	5' CCAACAGCTGCATTACATGTTGC3'	57
RTG2R	5' CAATTCCTATCAGCGCTCTAGCT3'	57
MAS6F	5' TGAACACCGTCCTGAATCACATTA3'	61
MAS6R	5' TGTCATGTTTGCCTCTTAGTGCAT3'	61
SSC1F	5' TGAACAAATGGTTAACGACGCTG3'	61
SSC1R	5' TCAAGGAGTTTTTCAGTATCGTTGG3'	61
AQY1F	5' ACACGTCGCTTTGACTGCATACA3'	61
AQY1R	5' GCCATACAGACCATGCTAAAATGG3'	61
PET9F	5' TGTTAAGTACGACGGTGCCTTTGA3'	61
PET9R	5' TGCGACACCTCTTAAGATGTTAGCA3'	61
AQY2F	5' GCTCTCATCCAGGTCAATTGATCAT3'	61
AQYR	5' CCCACCAGAAACACCAGATAGAAA3'	61
MKS1F	5' GTCGATGGATATCCCATCCAAGAA3'	61
MKS1R	5' TCAAGCCGTGATATTGTACGTACCA3'	61
IDH1F	5' CTTTCCTCCACGTTAATGTTGAACC3'	61
IDH1R	5' CTTCTGCGATCGTTTCATGAAGT3'	61

ZWF1F	5' TAACGAACTGGTCATCAGAGTGCA3'	61
ZWF1R	5' TGTGACTTGGGTAGCATTGACAGA3'	61
SAM50F	5' ATACGTCGTTGGGTAATTGCATAGG3'	61
SAM50R	5' AATCTTGCCATTGGGTGCCTTAGT3'	61
SAM35F	5' TTCGATAGTCACTCCATTGGACGTA3'	61
SAM35R	5' TACTCTTGACGATTTCTCGATGGC3'	61
POR2F	5' ATGTGCACGCTATGCTATGTCAATC3'	61
POR2R	5' TGGCTTTAGTTCCCACTTGCAAAT3'	61
PDA1F	5' TTTGCTGTGAGAACAACAAGTACGG3'	63
PDA1R	5' TTGGATGCTTGGTAGACAGCTAGAA3'	63
AKTYNAF	5' CCACCATGTTCCCAGGTATTGC3'	63
AKTYNAR	5' CACCAATCCAGACGGAGTACTTTC3'	63
TOM70F	5' CAGACAAGAACGATTTTGACAAGG3'	59
TOM70R	5' AACAAAGTGGCTTTACCGACCAA3'	59
SOD1F	5' GCTCCAAGTACGAAGTCAGAC3'	61
SOD1R	5' GGTAGGACCGATAAGCTTGATCAA3'	61
MGEF	5' CAATGGCACCAAGAAGTCCCTTTTG3'	63
MGER	5' CTTTGGATTCTTCACTTTTGGCTTC3'	63
SOD2F	5' CGAGCTGATTAAGTTGACCAACACA3'	61
SOD2R	5' TGACGGTATCCTGGTTGTAGGTTT3'	61
TOM40F	5' AAATGTCGAGGCAGGTATCGAAAC3'	61
TOM40R	5' TTAGCACCAATAGTGGTAGAACCCCT3'	61

5 Wykaz stosowanych odczynników

Zestawy odczynników

- „Clean Up” – zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych (A&A Biotechnology)
- „Plasmid Mini” – zestaw do izolacji ultraczystego DNA plazmidowego (A&A Biotechnology)
- „Gel – Out” – zestaw do oczyszczenia DNA z żelu (A&A Biotechnology)
- HotStart-IT[®] SYBR[®] Green qPCR Master Mix with UDG (2X) zestaw do PCR w czasie rzeczywistym (USB)
- RevertAid[™] Premium First Strand cDNA Synthesis Kit – zestaw do odwrotnej transkrypcji (Fermentas)
- odczynniki do reakcji PCR – 25mM MgCl₂, 10mM dNTP, 10X Bufor *Taq* zawierający (NH₄)₂SO₄ (Fermentas)
- „Rabbit Reticulocyte Lysate System”- odczynniki do translacji *in vitro* (Promega)

Enzymy

- Deoksyrybonukleaza I (DNase I, RNase-free, 1 U/μl, Fermentas)
- Polimeraza *Taq* – 5 U/μl (Fermentas)
- Rnasin – 40 U/μl (Promega)
- Rybonukleaza A – 10 mg/ml (Fermentas)
- Polimeraza RNA SP6 – 20 U/μl (Promega)
- Ligaza DNA T4 – 5 U/μl (Promega)
- Zymoliza – 100T – z *Atthrobacter luteus* [100000 U/g] – Seikagaku Corporation (Japonia)
- Glioksalaza I – (Sigma)
- Reduktaza gutationowa – (Sigma)
- Dysmutaza anionorodnika (SOD) – (Sigma)

Antybiotyki

- Ampicylina (100 μg/ml) – Sigma
- Karbenicylina (100 μg/ml) – Sigma

Markery masy cząsteczkowej kwasów nukleinowych i białek

- Gene ruler 100bp (Fermentas), długość fragmentów: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 pz.
- Page ruler Prestained Protein Ladder 11-170kDa (Fermentas)

Odczynnik firmy Bio-Rad:

Coomasie Brilliant Blue G-250, przeciwciało II-rzędowe: Goat Anti – Rabbit Ig (H+L) sprzężone z peroksydazą;

Odczynniki firmy Difco:

baktopepton, baktotrypton, ekstrakt drożdżowy;

Odczynniki firmy Serva:

PMSF, Ponceau S, SDS, TRIS;

Odczynniki firmy Sigma:

α -amanityna, akrylamid, ADP, AMP, antymycyna A, APS, askorbinian, ATP, bisakrylamid, BSA fr.V, cykloheksymid, cytochrom c, glicerol, glicyna, Hepes, sacharoza, TEMED, sorbitol, EGTA, EDTA, glicerol, IPTG, menadion, metotreksat, MOPS, NADH, octan sodu, TMPD, Tryton X-100, walinomycyna;

Odczynniki firmy Promega:

DTT, 7-metyloguanozyna (7mG (5) ppp (5)G), lizat z retikulocytów królika do przeprowadzenia translacji *in vitro*, Tween20, 5x stężony bufor do transkrypcji *in vitro*;

Odczynniki firmy POCH Gliwice:

β -merkptoetanol, błękit bromofenolowy, chloroform, kwas trójchlorooctowy;

Odczynniki firmy Chempur

alkohol izopropylowy/izoamylowy, chloroform, KCl, metanol, NaCl, 75% etanol;

Odczynniki innych firm:

Odczynniki ECL, – Amersham, Pharmacia Biotech, mannitol – Fluka, Trisol – Invitrogen, X-Gal (Fermentas), [³⁵S] metionina [1175 Ci/mmol] - Hartmann analytic, startery DNA – syntetyzowane w I.B.B. Warszawa;

6 Metody

6.1 Hodowla drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Hodowle prowadzono w temperaturze 28°C przy ciągłym wytrząsaniu na wytrząsarce Certomat R przy 180 rpm, w kolbach Erlenmeyera (100 ml) i Farenbacha (2 l), zawierających odpowiednio 25 ml i 850 ml pożywki.

Pożywki glukozowe (25 ml) stosowane były, aby uzyskać odpowiednie inokulum przy przeniesieniu określonych szczepów drożdży ze stałej pożywki glukozowej na płynną pożywkę glicerolową. Hodowle w małej objętości pożywki glicerolowej (25 ml) prowadzono w celu adaptacji hodowanych szczepów do warunków tlenowych oraz uzyskania odpowiedniego inokulum do hodowli masowych w dużych objętościach (850 ml).

Wzrost hodowli kontrolowano, mierząc gęstość optyczną (OD/ml) przy długości fali $\lambda=546$ nm. Pomiary przeprowadzono przy pomocy spektrofotometru Shimadzu UVPC-1602C.

Czas generacji badanych szczepów:

pożywka glicerolowa	szczep dziki	$\Delta por1$	$\Delta por2$
25 ml	4,4 h	8,8 h	4,6 h
850 ml	2,8 h	4,4 h	3,6 h

Hodowle prowadzono do osiągnięcia fazy logarytmicznej (OD \approx 1,0) i stacjonarnej (OD \approx 2,0).

6.1.1 Modyfikacje hodowli drożdżowych

Po osiągnięciu przez hodowle komórek drożdży OD \approx 0,1, do hodowli podawano menadion (10 μ M) lub askorbinian (10 mM), następnie prowadzono wzrost hodowli do osiągnięcia fazy logarytmicznej (OD \approx 1,0).

6.1.2 Przygotowywanie stoków drożdżowych

Przygotowano 15% glicerol w wodzie kwarcowej i sterylizowano w autoklawie. Pobierano sterylnie kolonię z szalki i wortekowano przez 5 minut. Zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

6.2 Badanie wpływu inhibitora transkrypcji i translacji

Drożdże zbierano w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu, odwirowywano od pożywki i następnie zawieszano w świeżej pożywce, 3 ml/g komórek. α -amanitynę (inhibitor transkrypcji) i cykloheksymid (inhibitor translacji) podawano w ostatecznych

stężeniach odpowiednio 40 µg/ml i 7,5 µg/ml. Komórki wytrząsano przez 60 min. w inkubatorze stołowym Brunswick C-24 przy 180 rpm w temperaturze 28°C. Po inkubacji drożdże przemywano wodą destylowaną i odwirowywano 3000xg przez 10 minut.

6.3 Preparacja sferoplastów drożdży

Drożdże zbierano w logarytmicznej fazie wzrostu ($OD \approx 1,0$) oraz w stacjonarnej fazie wzrostu ($OD \approx 2,0$). Komórki zostały oddzielone od pożywki na drodze wirowania przy 3000xg przez 10 min. Osad przemywano wodą bidestylowaną i następnie wirowano przy 3000xg przez 10 min. (procedurę powtarzano dwukrotnie). Osad zawieszano w płynie inkubacyjnym I (patrz Materiały p. 4.5), stosując 6 ml płynu inkubacyjnego na 1 g świeżej masy komórek. Następnie komórki inkubowano w 28°C na wytrząsarce Certomat R przy 120 rpm przez 15 min. Komórki wirowano przy 3000xg przez 10 min., a następnie przepłukiwano 1,2 M sorbitolem i zawieszano w płynie inkubacyjnym II (patrz Materiały p. 4.5), w proporcji 6 ml płynu/1g osadu. Otrzymaną zawiesinę łagodnie wytrząsano w inkubatorze stołowym typu Brunswick C-24 przy 120 rpm, w temperaturze 28°C. Do zawiesiny dodawano zymoliazę 100T (Seikagau Corporation, 100000 U/g) w proporcji 1 mg na 1 g osadu. Kontrolę trawienia prowadzono przez pomiar spadku gęstości optycznej przy długości fali $\lambda=546$ nm. Próbkę do pomiarów (5 µl/ml wody) pobierano w odstępach 5 min. Trawienie ściany komórkowej drożdży kończono, gdy wartość gęstości optycznej równa była 20% wartości początkowej (ok. 35 min.). Sferoplasty odwirowywano przy 3000xg przez 10 min. Osad płukano dwukrotnie 1,2 M sorbitolem.

6.4 Izolacja mitochondriów i frakcji cytozolowej

Preparację mitochondriów drożdży drogą wirowania różnicowego prowadzono według procedury opisanej przez Dauma i in. (1982). Skład płynów do izolacji podano w rozdziale „Materiały”, p. 4.6.

Sferoplasty zawieszano w mannitolu A w proporcji 6 ml płynu na 1 g sferoplastów. Homogenizację prowadzono ręcznie w homogenizatorze szklanym Dounca, stosując 10 suwów. Powstały homogenat wirowano przy 1000xg przez 10 min. Supernatant zbierano, a osad zawieszano ponownie w mannitolu A i homogenizowano jak wyżej. Po drugiej homogenizacji zawiesinę wirowano jak poprzednio. Uzyskane supernatanty łączono, a następnie wirowano przy 10000xg przez 10 min. Supernatant, który stanowi frakcję cytozolową (Sturtz i in., 2001), zachowywano do dalszych badań. Osad mitochondriów zawieszano w mannitolu B i wirowano przy 1000xg przez 5 min w celu pozbycia się pozostałych komórek. Otrzymany supernatant wirowano przy 10000xg przez 10 min. Osad, stanowiący frakcję mitochondrialną, dwukrotnie

przemywano mannitolem B i wirowano jak wyżej. Następnie mitochondria zawieszono w mannitolu C. Całość preparacji prowadzono w temperaturze 0-4°C.

6.4.1 Badanie jakości preparatu mitochondrialnego

Dla każdego preparatu mitochondrialnego przeprowadzano test pozwalający określić integralność zewnętrznej błony mitochondrialnej i stopień sprzężenia energetycznego. Pomiary zużycia tlenu prowadzono w temperaturze 25°C, przy użyciu elektrody tlenowej Rank (Rank Bros. Cambridge) w 0,5 ml płynu inkubacyjnego o pH 6,9 i składzie: 0,65 M Mannitol, 10 mM Hepes, 5 mM KCl, 10 mM bufor fosforanowy, 4 mM MgCl₂, 0,2% BSA. 1 ml płynu inkubacyjnego zawiera 480 nAtO (240 nmoli O₂) według Estabrook i in. (1967). Elektrode tlenową kalibrowano za pomocą silnego reduktora Na₂S₂O₄. Zapis szybkości zużycia tlenu rejestrowano przy użyciu dwukanałowego rejestratora potencjometrycznego TZ 4620.

W oznaczaniu stopnia integralności zewnętrznej błony mitochondrialnej wykorzystywano wzrost aktywności oksydazy cytochromowej, stymulowany dodaniem zredukowanego cytochromu c do inkubacji, obserwowany w przypadku uszkodzenia błony zewnętrznej (Wikstrom i Casey, 1985; Douce i in. 1984). Miarą maksymalnej aktywności oksydazy cytochromowej było utlenianie TMPD. W pomiarach integralności błony zewnętrznej stosowano następujące podania: 0,5 mg białka mitochondrialnego, antymycyna (5 µg/mg białka mitochondrialnego), 8 mM askorbinian, 0,06% cytochrom c, 1 mM TMPD. Wartości współczynnika integralności błony zewnętrznej wyznaczano stosując wzór:

$$R=(V_{\text{cytochrom}}-V_{\text{askorbinian}})/(V_{\text{TMPD}}-V_{\text{askorbinian}}) * 100\%$$

Pomiary stopnia sprzężenia energetycznego polegały na wyznaczeniu wartości współczynnika kontroli oddechowej (KO lub KO'; patrz p.1, Wykaz stosowanych skrótów). W pomiarach tych stosowano następujące podania: 1 mg białka mitochondrialnego, 1 mM NADH, 160 µM ADP (szczep dziki i mutant Δpor2) lub 800 µM ADP (mutant Δpor1), 1 µM FCCP. Wartość współczynnika kontroli oddechowej (KO) wyznaczano według Chance'a i Williamsa (1956), z uwzględnieniem stanu spoczynkowego (stan 4), następującego po wygaśnięciu stanu fosforylacyjnego (stan 3). W przypadku KO' wykorzystano stan oddechowy poprzedzający stan 3, czyli stan 2.

6.5 Preparacja mitoplastów

W celu otrzymania mitoplastów stosowano 2 µg mitochondriów na 1 µl buforu Hepes (pH 6,9, stężenie końcowe - 20 mM). Próby wytrząsano 20 minut w

temperaturze 0°C, a następnie wirowano 12000xg przez 10 minut. Osad rozpuszczano w wyjściowej objętości mannitolu C.

6.6 Metody pracy z białkami

6.6.1 Pomiar stężenia białka metodą Bradford

Stężenie białka oznaczano metodą Bradford (1967). W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej rozcieńczano odtłuszczoną BSA, by uzyskać roztwory o objętości 50 µl, zawierające od 1,25, do 20 µg białka. Następnie do każdej z badanych prób oraz do standardu BSA dodawano 2,5 ml pięciokrotnie rozcieńzonego odczynnika Bradford (Bio-Rad). Całość inkubowano przez 15 minut i dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda=595$ nm. Na krzywą wzorcową nanoszono odczyty OD prób białka o nieznanym stężeniu.

6.6.2 Wytrącanie białka

50 µg preparatu białkowego dopełniano wodą do 100 µl. Dodawano 20 µl 72% TCA. Przechowywano w -20°C przez 10 minut. Po rozmrożeniu wirowano 50 minut, 20000xg w temperaturze 2°C. Supernatant usuwano, a osad przemywano 1 ml schłodzonego acetonu (-20°C). Wirowano przez 15 minut w tych samych warunkach. Osad suszono przez 3 minuty w 52°C, a następnie rozpuszczano w buforze Lämmli i wytrząsano przez ok. 30 minut w 25°C.

6.6.3 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecylu sodu (SDS-PAGE)

Elektroforezę prowadzono według zmodyfikowanej metody Lämmli (1970). Badane preparaty zawieszano w buforze Lämmli (patrz Materiały 4.7.1). Próby denaturowano przez 3 minuty w 95°C. Elektroforezę prowadzono w buforze SDS-PAGE (patrz Materiały 4.7.2) przy natężeniu 30 mA przez około 2 godziny (w aparacie do elektroforezy firmy Kucharczyk).

Rozdzielone białka poddawano transferowi na nitrocelulozę w przypadku późniejszego przeprowadzania immunodetekcji bądź w przypadku białek znakowanych [³⁵S] metioniną, żełe barwiono w roztworze barwiącym (patrz Materiały p. 4.7.3) i odbarwiano w roztworze odbarwiającym (patrz Materiały p.4.7.4)

6.6.4 Elektrotransfer półsuchy

Rozdzielone elektroforetycznie białka przenoszono na nitrocelulozę metodą elektrotransferu półsuchego (w aparacie firmy Kucharczyk). W aparacie do elektrotransferu układano kolejno: trzy warstwy bibuły Whatman, nitrocelulozę, żel i

ponownie 3 warstwy bibuły. Bibułę i nitrocelulozę nasączano buforem do elektrotransferu (patrz Materiały p.4.7.5). Elektrotransfer prowadzono przy natężeniu 250 mA przez 75 min., przy maksymalnym napięciu 20 V. Po zakończeniu elektrotransferu nitrocelulozę barwiono w 0,2% roztworze Ponceau w 3% TCA przez 2 minuty, po czym płukano wodą bidestylowaną.

6.6.5 Immunodetekcja białek

W celu zablokowania niespecyficznego miejsca wiązania przeciwciał na uzyskanym blacie, arkusz nitrocelulozy inkubowano z lekkim wytrząsaniem przez 45 minut w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w buforze TBS (patrz Materiały 4.7.6). Następnie blót inkubowano godzinę z przeciwciałem I-rzędowym (1:500) i przemywano: dwa razy po 5 minut w buforze TBS-Tween (0,05% Tween 20) i jeden raz 5 minut w buforze TBS. Następnie blót inkubowano w roztworze przeciwciała II-rzędowego, sprzężonego z peroksydazą. Przeciwciała II-rzędowe rozcieńczano w stosunku 1:5000, w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w proszku w buforze TBS. Nitrocelulozę ponownie przepłukiwano (jak powyżej).

Peroksydaza sprzężona z przeciwciałem II-rzędowym umożliwia emisję światła, dzięki utlenianiu luminalu. Reakcja ta ulega wzmocnieniu w obecności wzmacniaczy typu fenoli. Luminal i wzmacniacze są składnikami tzw. odczynników ECL. Nitrocelulozę inkubowano przez 2 minuty w mieszaninie (1:1) odczynników ECL, umieszczano w folii i przenoszono do kasety, po czym nakładano kliszę rentgenowską (Fuji Medical RX). Po 5-30 minutowej ekspozycji kliszę wywoływano. Intensywność uzyskanych prążków wyznaczano za pomocą programu ScanPack 3.0, po uprzednim zeskanowaniu kliszy.

6.7 Pomiar uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego

Poziom uwalniania O_2^- z mitochondriów i mitoplastów odzwierciedla szybkość redukcji przez błękit nitrotetrazolowy (NBT). Inkubację mitochondriów prowadzono w buforze M (patrz Materiały p. 4.9.2). Szybkość redukcji NBT mierzono spektrofotometrycznie, przy długości fali $\lambda = 560$ nm i w obecności etanolu jako substratu oddechowego. Stosowano: 100 μ g mitochondriów, 30 mM etanol, NBT (0,07 mg/ml), podawany po 30 sekundach. Jako kontrolę uwalniania anionorodnika stosowano podanie dysmutazy anionorodnika ponadtlenkowego. Do przeprowadzenia doświadczenia używano spektrofotometr UV 1602, Shimadzu.

6.8 Określenie wewnątrzkomórkowego stanu redoks

Wartości stanu redoks w obrębie frakcji cytozolowej i mitochondriów odpowiadają wartościom wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$. Stężenia $GSH+GSSG$ i GSH

(w nmol/mg białka) wyznaczano odpowiednio w obecności reduktazy glutationowej i glioksalazy I (według Bartosz, 2003)

Oznaczenie całkowitego stężenia glutationu (GSH + GSSG)

Metoda wykorzystuje utlenianie glutationu przez DTNB i redukcję przez NADPH, a miarą stężenia glutationu w próbce jest szybkość przyrostu absorbancji.

1 ml zawiesiny mitochondriów/cytozolu poddawano ekstrakcji przez 30 min. w 0°C dodając 0,5 ml roztworu zawierającego 2 mM EDTA i 1 M PCA, po czym wirowano przez 15 min przy 12000xg. W celu zubożenia do supernatantu dodawano bufor MOPS-KOH (0,3 M MOPS w 2 M KOH) i ponownie wirowano. Supernatant natychmiast wykorzystywano do pomiarów.

Do kuwety spektrofotometrycznej podawano 1000 μ l 0,1 M buforu fosforanowego, zawierającego 1 mM EDTA, pH 7,0, 100 μ l supernatantu zawierającego 0,5-2 nM glutationu, 50 μ l roztworu NADPH (o stężeniu 4 mg/ml w 0,5% NaHCO₃), 20 μ l roztworu DTNB (o stężeniu 1,5 mg/ml w 5% NaHCO₃) i 20 μ l roztworu reduktazy glutationowej (roztwór reduktazy glutationowej o aktywności 6 U/ml – preparat handlowy rozcieńczony w 0,1 M buforze fosforanowym z 1 mM EDTA, pH 7,0). Po wymieszaniu mierzono absorbancję przy 412 nm jako funkcję czasu. Równolegle przygotowywano i mierzono próbę kontrolną, do której podawano 100 μ l wody zamiast supernatantu. Krzywą wzorcową przygotowywano przez podawanie zamiast badanego supernatantu, roztworu GSSG, otrzymanego przez rozcieńczanie 1 mM roztworu GSSG w wodzie, zubożonego NaOH o pH 7,0, w zakresie 0-2 μ M. Przy obliczeniach uwzględniano rozcieńczanie wynikające z przygotowania ekstraktów i ich zubożenia.

Oznaczenie stężenia GSH

W obecności glioksalazy I glutation reaguje z metyloglioksałem, tworząc barwny koniugat (s – laktoilglutation), którego stężenie oznacza się poprzez pomiar absorbancji.

Do kuwety spektrofotometrycznej podawano: 50 mM bufor fosforanowy, pH 7,0, porcję ekstraktu zawierającą 2 – 100 nmol GSH i 2 μ l glioksalazy I (1000 U/ml). Całkowita objętość płynu wynosiła 1 ml. Absorbancję mierzono przy 240 nm. Reakcję rozpoczynano podaniem 20 μ l metyloglioksalu (110 mM roztwór metyloglioksalu – 20 μ l metyloglioksalu rozcieńczono 1 ml buforu fosforanowego, pH 7,0). Równolegle mierzono próbę kontrolną bez ekstraktu. Stężenie GSH mierzono w preparacie na podstawie krzywej wzorcowej, dodając różne ilości 1 mM roztworu GSH, zamiast

ekstraktu. Uwzględniano rozcieńczenie wynikające z przygotowania ekstraktów i ich zobojętniania

6.9 Pomiar aktywności enzymów antyoksydacyjnych

Reduktaza glutationowa (GR)

Aktywność GR oznaczano spektrofotometrycznie poprzez pomiar szybkości utleniania NADPH w czasie redukcji GSSG przy 340 nm. Badaną próbkę dodawano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej 50 mM bufor fosforanowy (pH 7,0) z dodatkiem 0,5 mM EDTA oraz 0,25 mM NADPH. Przed dodaniem GSSG do końcowego stężenia 1 mM i pomiarem spektrofotometrycznym próbkę inkubowano przez 1 min w temperaturze pokojowej. Pomiaru dokonywano w objętości 1,5 ml.

Peroksydaza glutationowa (GP)

Aktywność GP oznaczano spektrofotometrycznie poprzez pomiar szybkości utleniania NADPH przy 340 nm. Mieszanina reakcyjna zawierała: 50 mM bufor fosforanowy (pH 7,0), 5 mM glutation, 1 mM t-BHT, 0,16 mM NADPH, 1 mM NaN_3 , 0,24 U/ml GR oraz 50-100 μg mitochondriów. Przed dodaniem t-BHT mieszaninę inkubowano 5 min. w 25°C. Reakcję zapoczątkowywało podawanie t-BHT. Spadek absorbancji mierzono przez 1 min. Do każdego oznaczenia stosowano trzy próby kontrolne:

- (1) – z pominięciem GSH (w celu wyeliminowania niezależnego od GSH utleniania NADPH)
- (2) – z pominięciem t-BHT (w celu wyeliminowania niezależnego od GP utleniania NADPH)
- (3) – z pominięciem ekstraktu (w celu wyeliminowania niezależnego od GP utleniania NADPH)

W celu uzyskania aktywności GP, stosowano następujące równanie:

$$\text{Aktywność GP} = \text{badana próba} - (1) + (2) + (3)$$

(Jednostka aktywności – ilość enzymu, utleniająca 1 μmol glutationu na minutę, w temperaturze 25°C)

Pomiaru dokonywano w objętości 1 ml.

Katalaza

Aktywność katalazy oznaczano przez pomiar szybkości spadku stężenia nadtlenu wodoru. Szybkość tę obserwowano, mierząc spadek absorbancji przy długości fali 240 nm, w 2 ml mieszaniny reakcyjnej: 50 mM bufor fosforanowy (pH 7,0), 0,5 mM EDTA, 10 mM H₂O₂ i 50 µg frakcji cytozolowej.

Dysmutazy ponadtlenkowe (CuZnSOD i MnSOD)

Aktywność enzymów mierzono z wykorzystaniem metody cytochromowej (Rice-Evans i in., 1991). Mieszanina reakcyjna posiadała następujący skład: 50 mM bufor fosforanowy (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 7 µg/ml ksantyna, 0,23 mg/ml cytochrom c, 0,2 U/ml oksydaza ksantynowa, 10–30 µg frakcji cytozolowej lub 5–20 µg mitochondriów. Wytwarzanie O₂⁻, połączone z redukcją cytochromu c obserwowano mierząc spadek absorbancji przy długości fali 550 nm, w obecności 5 mM KCN (inhibitor CuZnSOD).

6.10 Metody stosowane w ocenie ekspresji genów na poziomie mRNA

6.10.1 Izolacja RNA z drożdży z wykorzystaniem Trizolu

Okolo 1 g komórek drożdżowych odwirowywano w sterylnej probówce o objętości 50 ml i zamrażano w ciekłym azocie. Następnie homogenizowano z Trizolem (1 ml na 100 mg komórek) przez 2 minuty. Preparat pozostawiono na 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym przenoszono do próbki Eppendorfa. Dodawano 0,2 ml chloroformu na 1 ml Trizolu. Intensywnie wytrząsano przez 20 sekund, a następnie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Wirowano przez 15 minut w temperaturze 2°C przy 12000xg. Fazę wodną (górną) przenoszono do nowych probówek. Dodawano izopropanol (0,5 ml na 1 ml Trizolu) i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, co jakiś czas mieszając przez odwracanie probówek. Wirowano (10 minut, 12000g, 4°C), osad przemywano 75% etanolem (1 ml), a następnie suszono na powietrzu. Rozpuszczano w 50 µl wody wolnej od RNaz.

6.10.2 Traktowanie preparatów RNA DNazą

Reakcję przeprowadzano w temperaturze 37°C przez 60 minut. Dodawano bufor „Stop”, po czym próby inkubowano przez 10 minut w temperaturze 65°C. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli.

RNA	5 µg
Bufor dla DNazy (10x)	5 µl
DNaza (1 U/µl)	7 µl
Woda	do 50 µl

6.10.3 Odwrotna transkrypcja

Do przeprowadzania doświadczenia stosowano zestaw do odwrotnej transkrypcji - RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Reakcja zachodziła w objętości 60 µl. W pierwszym etapie dodawano do próbek (o objętości 0,5 ml) 3 µl startera Oligo (dT)₁₈ (0,5 µg/µl) oraz 5 µg RNA. Dopełniano wodą do objętości 36 µl i w temperaturze 75°C przez 10 minut następowała denaturacja RNA. Próby umieszczano w lodzie na 5 minut, a następnie dodawano pozostałe odczynniki:

Woda	4,5 µl
Bufor dla odwrotnej transkryptazy (5 x)	12 µl
Inhibitor rybonukleaz (40 U/µl)	1,5 µl
dNTP (10 mM)	3 µl
odwrotna transkryptaza	3 µl

Próby umieszczono w termocyklerze Eppendorf Mastercycler, ustawionym na profil termiczny: 42°C przez 60 minut, 70°C przez 10 minut, schładzanie do 4°C. Uzyskane cDNA rozcieńczano ośmiokrotnie i stosowano jako matrycę do reakcji PCR.

6.10.4 PCR w czasie rzeczywistym

Reakcje przeprowadzano w aparacie Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System, z wykorzystaniem płytek 384 – dołkowych. Do reakcji, zachodzącej w objętości 20 µl, stosowano zestaw HotStart-IT® SYBR® Green qPCR Master Mix, 0,25 µM startery oraz cDNA uzyskane z 68 ng całkowitego RNA. Jako kontrolę negatywną stosowano próby bez cDNA. Przeprowadzono 9 reakcji (3 powtórzenia techniczne i trzy powtórzenia biologiczne) dla każdego typu hodowli. Reakcje prowadzono według programu:

Denaturacja	95°C	4 minuty	
Denaturacja	95°C	15 sekund	40 cykli
Przyłączanie starterów	57-63°C	15 sekund	
Elongacja	72°C	40 sekund	
Schładzanie do 4°C			

Ostatni etap profilu termicznego stanowiła analiza jakości (specyficzność, obecność zanieczyszczeń i obecność dimerów starterów) powstających produktów z wykorzystaniem krzywej topnienia w zakresie temperatur od 60 do 95°C. W celu przeliczenia poziomu fluorescencji na liczbę kopii cząsteczek cDNA, kodującego badane geny, zastosowano serię rozcieńczeń (100, 1000, 10000, 100000, 1000000 cząsteczek) amplikonu, który wcześniej został zrekombinowany z wektorem pGEM-T Easy. Przeliczenia zostały wykonane z wykorzystaniem oprogramowania SDS 2.3 (Applied Biosystems). Poziom ekspresji badanych genów określono poprzez porównanie z liczbą cząsteczek cDNA genów kontrolnych (*ACT1* i *MGE*)

6.11 Metody stosowane podczas klonowania DNA

6.11.1 Amplifikacja metodą PCR

Amplifikacje przeprowadzano przy użyciu termocyklera Biometra T3. Stężenia reagentów w mieszaninie reakcyjnej wynosiły: 0,2 μM dNTP, 1,5 mM Mg²⁺, 0,25 μM startery, 0,01-5 ng matrycy DNA, 2 U/100 μl polimerazy Taq. Reakcję prowadzono w objętościach 15 – 30 μl, według profilu termicznego:

Denaturacja	95°C	2 minuty	
Denaturacja	95°C	15 sekund	28 cykli
Przyłączanie starterów	57-63°C	10 sekund	
Elongacja	72°C	35 sekund	
Elongacja	72°C	5 minut	
Schładzanie do 4°C			

6.11.2 Ligacja

Ligacje do wektora pGEM-T Easy przeprowadzano z użyciem 10 ng wektora. Stosunek pmoli końców wektora do insertu wynosił 1:3. Stosowano 2 U T4 DNA ligazy na 10 μl mieszaniny ligacyjnej. Reakcje prowadzone były przez noc w temperaturze 4°C.

6.11.3 Transformacja komórek kompetentnych mieszaniną ligacyjną

10 μl mieszaniny ligacyjnej dodawano do 100 μl komórek kompetentnych DH5α. Komórki inkubowano w lodzie przez 1 godzinę. Następnie przez 1,5 minuty przeprowadzano szok cieplny w temperaturze 42°C i ponownie umieszczano w lodzie

na 5 minut. Wysiewano na szalki z karbenicyliną (100 µg/ml), na które wcześniej nanoszono po 40 µl IPTG (100 mM) oraz X-Gal (2%). Szalki inkubowano przez noc w temperaturze 37°C.

6.11.4 Przeszczepienie kolonii bakteryjnych

Kolonie bakterii z wbudowanym insertem zostały przeszczepione na nową pożywkę LB (tzw. kwadraty). O obecności insertu w plazmidzie świadczył biały kolor kolonii. Wprowadzony fragment inaktywował gen B – galaktozydazy, rozkładający X – Gal do produktu o zabarwieniu niebieskim.

6.11.5 Zaszczepienie pożywek do izolacji plazmidów

Z każdego „kwadratu” została pobrana sterylną końcówką do pipety niewielka ilość bakterii i przeniesiona do płynnej pożywki LB z karbenicyliną. Hodowla była prowadzona na wytrząsarce przy 150 rpm w 37°C przez 18 godzin.

6.11.6 Izolacja ultraczystego plazmidowego DNA

Izolację plazmidowego DNA przeprowadzano zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu Plasmid Mini firmy A&A Biotechnology.

6.11.7 Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych

Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych przeprowadzano w żelu agarozowym z bromkiem etydyny (o stężeniu 0,2 µg/ml) w buforze TAE (patrz Materiały, p. 4.9.5) przy natężeniu 60 mA. Analizowane kwasy nukleinowe przed nakładaniem na żel mieszano z barwnikiem 6xSB. Do elektroforezy plazmidów stosowano żele z 1% agarozą. RNA, DNA i produkty reakcji PCR rozdzielano w żelach 1,2%.

6.11.8 Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie przeprowadzono przy użyciu odczynników i sprzętu CEQ 2000 Dye Terminator Sequencing firmy Beckman Coulter zgodnie z zaleceniami producenta w Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii UAM.

6.12 Nadekspresja białka pb₁₂-DHFR

Szczep DH1, zawierający plazmid pb₂(1-167)DHFR, wysiano na płytkę z ampicyliną (70 µg/ml) i inkubowano przez 16 godzin w 37°C. Pojedynczą kolonię przeszczepiono na nową płytkę z antybiotykiem i inkubowano jak powyżej. Pojedyncza kolonia została pobrana i przeszczepiona do 25 ml płynnej pożywki, zawierającej

ampicylinę o stężeniu 200 µg/ml. Po nocnej hodowli zaszczerpiono 250 ml pożywki, w stosunku 1:1000 i wytrząsano w 37°C. Po ok. 4 godzinach, gdy OD₆₀₀ wynosiło ok. 0,5, podawano 1 mM IPTG i wytrząsano przez godzinę. Hodowlę wirowano przez 10 minut przy 3000xg. Osad zamrażano w ciekłym azocie.

6.13 Oczyszczanie białka pb₁₂-DHFR po nadekspresji

Osad bakteryjny zebrany ze 100 ml hodowli zawieszono w 2 ml buforu 1 (patrz Materiały, p. 4.9.1). Podawano 2 mg lizozymu i inkubowano z wytrząsaniem 30 rpm w temperaturze pokojowej. Podawano EDTA do końcowego stężenia 25 mM i Tryton X-100 do stężenia 2%. Sonikację prowadzono w warunkach chłodniczych, 3x15 sekund, z przerwami 30-sekundowymi, w pozycji „2”. Wirowano przez 30 minut, 50000xg, 4°C. Do osadu dodawano 10 ml buforu 2 (patrz Materiały, p. 4.9.1). Sonikowano 1x15 sekund w pozycji „1”, 2x15 sekund w pozycji „2”, 3x15 sekund w pozycji „3”, 7x15 sekund w pozycji „4”. Wirowano jak poprzednio. Do osadu podawano 10 ml buforu 3 (patrz Materiały, p. 4.9.1), sonikowano 7x15 sekund w pozycji „4” i wirowano jak poprzednio. Do osadu podawano 10 ml buforu 4 (patrz Materiały, p. 4.9.1). Sonikowano 4x15 sekund w pozycji 4. Wirowano jak poprzednio. Do osadu podawano 0,4 ml buforu 5 (patrz Materiały, p. 4.9.1) i sonikowano 4x15 sekund w pozycji „4”. Próby zamrażano w ciekłym azocie.

6.14 Import białka do mitochondrium

6.14.1 Transkrypcja *in vitro*

Reakcje transkrypcji przeprowadzono w temperaturze 37°C, przez 60 minut, w 100 µl mieszaniny:

5 x Bufor do transkrypcji	20 µl
RNasin (40 U/µl)	4 µl
DTT (0,1 M)	10 µl
7-metyloguanozyna (7mG (5) ppp (5)G) (2,5 mM)	5,2 µl
rNTP – (2,5 mM)	0,5 µl każdego
SP6 polimeraza RNA (20 U/µl)	3 µl
DNA plazmidowe	10 µg
Woda	do 100 µl

W celu wytrącenia uzyskanego mRNA, po inkubacji do próby dodawano 10 µl 10 M LiCl i 300 µl 96% etanolu. Wytrącanie przeprowadzono w -20° C przez 20 min. Następnie

próby wirowano przez 30 min. przy 36000xg. Po odwirowaniu osad przemywano trzy razy 70% etanolem. Osad suszono i rozpuszczano w 100 μ l sterylnej wody z dodatkiem RNasinu (2,5 μ l na 100 μ l wody). Uzyskane mRNA zamrażano w celu użycia do reakcji translacji *in vitro*.

6.14.2 Translacja *in vitro*

Translację *in vitro* prowadzono w objętości 171,5 μ l. Do 15 μ l mRNA (600 ng/ μ l) dodawano: 87,5 μ l lizatu z retikulocytów królika, 2,5 μ l mieszaniny aminokwasów - z wyjątkiem metioniny, (wyjściowe stężenie aminokwasów 1 mM), 6 μ l [³⁵S] metioniny [1175 Ci/mmol] oraz 15,5 μ l wody. Mieszaninę inkubowano z wytrząsaniem w 30°C przez 60 min. Następnie podawano 15 μ l nieznakowanej metioniny, o wyjściowym stężeniu 58 mM i 30 μ l sacharozy o wyjściowym stężeniu 1,5 M, w celu wypłukania nadmiaru radioaktywnej metioniny i uzyskania odpowiedniej osmotyczności roztworu. Uzyskany translat został natychmiast użyty do reakcji importu. Transkrypcję i translację prowadzono dla konstruktów Su9 - DHFR i cDNA Tob55.

6.14.3 Import białka do mitochondriów

Import prowadzono dla białek znakowanych [³⁵S] metioniną (Tob55 i Su9-DHFR) oraz dla poddanego nadekspresji białka pb₂-DHFR.

W przypadku pb₂-DHFR mitochondria lub mitoplasty inkubowane były w buforze do importu (patrz Materiały p. 4.8.3). Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 3 min. w 25°C, a następnie podawano pb₂-DHFR (3 μ g na 50 μ g białka mitochondrialnego). Reakcję prowadzono w objętości 200 μ l przez 20 min. w 25°C. Import zatrzymywano, przenosząc mitochondria do lodu. Każda próba została podzielona na dwie równe części, przy czym jedną z nich traktowano proteinazą K (250 μ g/ml) przez 10 minut w 0°C, a reakcja trawienia zatrzymywana była przez podanie 1 mM PMSF. Następnie próby wirowano przy 12000xg przez 10 minut, przemywano buforem SM (patrz Materiały, p. 4.8.5) i ponownie wirowano. Następnie próby zawieszono w 2x stężonym buforze Lämmli. Próby rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (patrz Metody, p. 6.6.3) i poddawano detekcji przy wykorzystaniu specyficznych przeciwciał (patrz Materiały p. 4.3).

W przypadku białka Su9-DHFR, znakowanego [³⁵S] metioniną, mitochondria (100 μ g) inkubowane były przez 3 minuty w 25°C w buforze do importu Su9-DHFR (patrz Materiały, p. 4.8.4), w obecności ATP (2 mM) i etanolu (20 mM). Następnie podawano 10 μ l lizatu z Su9 – DHFR. Reakcję importową przeprowadzano w czterech czasach (0, 5, 10 i 20 minut), w końcowej objętości 200 μ l. Każda próba została

podzielona na dwie równe części, przy czym jedną z nich traktowano proteinazą K (250 µg/ml) przez 10 minut w 0°C, a reakcja trawienia zatrzymywana była przez podanie 1 mM PMSF. Do każdej próby dodano 900 µl buforu do przemywania po imporcie Su9-DHFR (patrz Materiały, p. 4.8.4) i wirowano 12000xg przez 15 minut. Do osadu podawano 20 µl buforu Lämmli, gotowano i zamrażano w -80°C.

W przypadku znakowanego [³⁵S] metioniną białka Tob55, mitochondria (100 µg) inkubowane były 3 minuty w 25°C, w buforze do importu Tob55 (patrz Materiały, p. 4.8.1) w obecności 2 mM ATP. Następnie podawano 10 µl lizatu z Tob55. Reakcję importową przeprowadzano w 4 czasach (0, 5, 10 i 20 minut), w końcowej objętości 200 µl. Każda próba została podzielona na dwie równe części, przy czym jedną z nich traktowano proteinazą K [250 µg/ml] przez 10 minut w 0°C, a reakcja trawienia zatrzymywana była przez podanie 1 mM PMSF. Do każdej próby dodano 900 µl buforu SM (patrz Materiały, p. 4.8.5) i wirowano 12000xg przez 15 minut. Do osadu podawano 20 µl buforu Lämmli, gotowano i zamrażano w -80°C.

6.14.4 Autoradiografia

Żele poliakrylamidowe, w których prowadzono rozdziały białek, po wybarwieniu (patrz Materiały p. 4.7.3) suszono na suszarce z pompą próżniową, po czym umieszczano w kasecie, nakładano klisze fotograficzne (Amersham) i poddawano ekspozycji w -80°C przez 10 dni.

6.14.5 Blokada kompleksu TOM przez chemiczne ilości białka chimerowego

pb₂-DHFR

Blokadę kompleksu TOM przez białko chimerowe wykonywano w warunkach, prowadzących do zatrzymania importu w trakcie translokacji przez błonę zewnętrzną (Rapaport, 1997 i 1998 b) oraz podczas translokacji przez obie błony mitochondrialne (Voos i in., 1994; Dekker i in., 1997).

W pierwszym przypadku mitochondria i mitoplasty inkubowane były w buforze do importu pb₂-DHFR (patrz Metody p. 6.14.3.) w obecności walinomycyny (0,16 µg na 1 mg białka mitochondrialnego) przez 15 minut w temperaturze 25°C, w obecności 1 µg białka pb₂-DHFR (wyjściowe stężenie 8 µg/µl) na 50 µg białka mitochondrialnego. Natomiast zatrzymanie importu białka pb₂-DHFR w trakcie translokacji przez obie błony mitochondrialne prowadzono w tych samych warunkach, ale przy braku walinomycyny i w obecności 2 µM metotraksatu (MTX). Jest to czynnik sieciujący, który stabilizuje DHFR w formie pofałdowanej, co uniemożliwia translokację pb₂-DHFR do matriks. W obu przypadkach po zakończonej reakcji, próby przemywano buforem wysokosolnym

HS (patrz Materiały, p. 4.9.3), w celu usunięcia białka związanego na powierzchni mitochondriów, następnie osad zawieszano w mannitolu C do objętości wyjściowej.

W doświadczeniach, w których prowadzono wstępną obróbkę mitochondriów z zastosowaniem trypsyny, przed rozpoczęciem właściwej reakcji wiązania importowanego białka, mitochondria inkubowano w obecności trypsyny (50 µg/ml) przez 15 min. w 0°C, a następnie podawano sojowy inhibitor trypsyny (1 mg/ml). W próbach kontrolnych trypsyna i inhibitor podawane były jednocześnie.

7 Wyniki

7.1 Ocena jakości preparatów mitochondriów szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$

Do oceny jakości uzyskanych preparatów mitochondriów wykorzystywano sprzężenie energetyczne oraz integralność zewnętrznej błony mitochondrialnej. Aby ocenić sprzężenie energetyczne, wyznaczano wartości współczynnika kontroli oddechowej (KO, patrz Metody, p. 6.4.1) w obecności 1 mM NADH, który stosowano jako substrat oddechowy. Stan 3 (fosforylujący stan oddechowy) indukowano podaniem 160 μ M ADP w przypadku mitochondriów szczepu dzikiego i $\Delta por2$ oraz 800 μ M dla mutantu $\Delta por1$. Zastosowanie dużo wyższego stężenia ADP w przypadku mitochondriów $\Delta por1$ wynika z ograniczeń w jego transporcie przez błonę zewnętrzną (Michejda i in., 1994). Skutkiem tego w przypadku mitochondriów $\Delta por1$ nie obserwowano zakończenia stanu 3 i pojawienia się stanu 4. Dlatego do wyznaczenia wartości KO wykorzystywano szybkość stanu 2, tj. stanu oddechowego obserwowanego po podaniu substratu oddechowego. Integralność błony zewnętrznej szacowano na podstawie wartości współczynnika I, stanowiącego miarę dostępu podanego z zewnątrz cytochromu c do wewnętrznej błony mitochondrialnej (patrz Metody, p. 6.4.1) Typowe wartości badanych parametrów zestawiono w tab. 1.

Parametr	Szczep dziki	$\Delta por1$	$\Delta por2$
I	96%	94%	97%
KO	3,4	3,3	3,6

Tab.1.

Typowe wartości parametrów stosowanych przy ocenie jakości preparatów mitochondriów szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$.

Zatem, w niniejszej pracy stosowano preparaty mitochondriów z integralną błoną zewnętrzną i o dobrej jakości pod względem sprzężenia energetycznego.

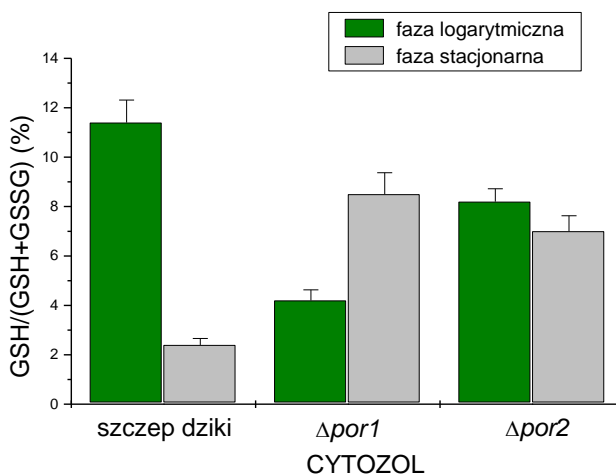
7.2 Izof formy białka VDAC pośredniczą w determinacji stanów oksydacyjno-redukcyjnych (redoks) w komórkach *S. cerevisiae*

Wewnątrzkomórkowe stany redoks szacowano poprzez pomiar stężenia zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG) formy glutationu (patrz Metody, p. 6.8) oraz wyznaczenie wartości wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$, gdzie $GSH+GSSG$ oznacza całkowitą ilość glutationu. Zmiany zawartości GSH, zmniejszającej się w wyniku

utlenienia i wzrastającej na skutek redukcji odzwierciedlają zmiany stanu redoks (Jo i in., 2001; Wojtczak i Slyshenkov, 2003). Wartości wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$ wyznaczano dla frakcji cytozolowych i mitochondriów izolowanych z komórek szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w różnych fazach wzrostu.

7.2.1 Stan redoks w obrębie cytozolu komórek *S. cerevisiae* zależy od izoform białka VDAC i fazy wzrostu

Dla frakcji cytozolowych izolowanych z komórek badanych szczepów *S. cerevisiae* (szczep dziki oraz mutanty $\Delta por1$ i $\Delta por2$) otrzymano różne wartości wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$, zależnie od analizowanej fazy wzrostu i typu komórek (rys. 7.1). Dla szczepu dzikiego i $\Delta por2$ przejście z fazy logarytmicznej do fazy stacjonarnej wzrostu powodowało zmniejszenie wartości wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$, co odpowiada zwiększeniu stopnia utlenienia w obrębie cytozolu. Jednakże obserwowane zmiany różniły się swoim zakresem. Wartość wskaźnika $GSH/GSH+GSSG$ dla szczepu dzikiego zmniejszyła się z $11,4 \pm 0,9\%$ do $2,4 \pm 0,3\%$, podczas gdy dla $\Delta por2$ odnotowano zmniejszenie wartości wskaźnika z $8,2 \pm 0,5\%$ do $7 \pm 0,6\%$. Natomiast w przypadku $\Delta por1$, przejściu z fazy logarytmicznej do fazy stacjonarnej wzrostu, towarzyszył wzrost wartości wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$ z $4,2 \pm 0,4\%$ do $8,5 \pm 0,9\%$, co odpowiada wzrostowi stanu redukcji w obrębie cytozolu.



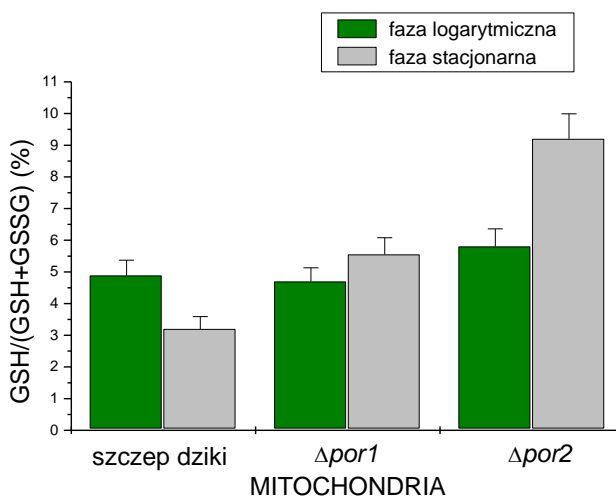
Rys. 7.1

Stan redoks w obrębie frakcji cytozolowej izolowanej z komórek szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w fazie logarytmicznej i stacjonarnej wzrostu. Wartości stanu redoks odpowiadają wartościom wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$. Stężenia $GSH+GSSG$ i GSH we frakcjach cytozolowych (w nmol/mg białka) wyznaczano według procedury opisanej w Metodach (p. 6.8) w obecności, odpowiednio, reduktazy glutationowej i glioksalazy I. Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla sześciu odrębnych eksperymentów.

7.2.2 Stan redoks mitochondriów *S. cerevisiae* zależy od izoform białka VDAC i fazy wzrostu

Podobnie jak stan redoks w obrębie cytozolu (patrz Wyniki, p. 7.2.1), mitochondrialny stan redoks został określony za pomocą wskaźnika GSH/GSH+GSSG (rys. 7.2). Przejściu z fazy logarytmicznej do stacjonarnej towarzyszyło utlenienie w obrębie mitochondriów szczepu dzikiego, podczas gdy w przypadku mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ obserwowano redukcję. Dla mitochondriów szczepu dzikiego wartość wskaźnika GSH/(GSH + GSSG) zmniejszyła się z $4,9 \pm 0,5\%$ do $3,2 \pm 0,4\%$, podczas gdy wartość tego wskaźnika w przypadku mitochondriów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ wzrastała odpowiednio z $4,7 \pm 0,4\%$ do $5,6 \pm 0,5\%$ i z $5,8 \pm 0,6\%$ do $9,2 \pm 0,8\%$.

Zatem, w wyniku przejścia komórek z logarytmicznej do stacjonarnej fazy wzrostu, w przypadku szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$ obserwowano ten sam kierunek zmian stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów, podczas gdy w przypadku mutantu $\Delta por2$ zmiany stanów redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów nie były skoordynowane. W związku z tym, zależnie od rozpatrywanego przedziału komórkowego, mutant $\Delta por2$ wykazywał podobieństwo bądź do szczepu dzikiego (cytozol) bądź do mutantu $\Delta por1$ (mitochondria).

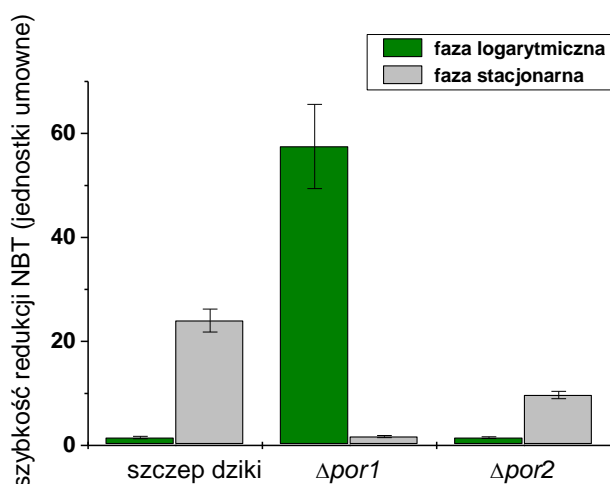


Rys. 7.2

Stan redoks w obrębie mitochondriów izolowanych z komórek szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w fazie logarytmicznej i stacjonarnej wzrostu. Wartości stanu redoks odpowiadają wartościom wskaźnika GSH/(GSH+GSSG). Stężenia GSH+GSSG i GSH w izolowanych mitochondriach (w nmol/mg białka) wyznaczano według procedury opisanej w Metodach (p. 6.8) w obecności, odpowiednio, reduktazy glutationowej i glioksalazy I. Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla sześciu odrębnych eksperymentów.

7.3 Poziom uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) z mitochondriów zależy od izoform białka VDAC i fazy wzrostu.

Jest faktem dobrze znanym, iż kanał VDAC pełni istotną rolę w uwalnianiu anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) z mitochondriów (Han i in., 2003). Dlatego też postanowiono sprawdzić, czy różnice wewnątrzkomórkowych stanów redoks obserwowane dla szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w różnych fazach wzrostu wynikać mogą z różnic w uwalnianiu $O_2^{\cdot-}$. Poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów określono wyznaczając szybkość redukcji NBT (błękit nitrotetrazolowy) przez mitochondria, przy czym adekwatność pomiaru sprawdzano podając dysmutazę ponadtlenkową. Jako substrat oddechowy zastosowano etanol, dyfundujący swobodnie przez błony fosfolipidowe, aby wyeliminować wpływ braku funkcjonalnego kanału VDAC na dostęp substratu do łańcucha oddechowego (patrz Metody, p. 6.7).



Rys. 7.3

Szybkość redukcji NBT przez mitochondria badanych szczepów drożdży, odzwierciedlająca poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów. Mitochondria izolowano z komórek szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Inkubację prowadzono w buforze M (0.65 M mannitol, 10 mM Hepes, pH 6,9, 10 mM bufor fosforanowy, pH 6,9, 5 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$ i 0.2% BSA). Szybkość redukcji NBT mierzono spektrofotometrycznie, przy długości fali $\lambda = 560$ nm i w obecności etanolu jako substratu oddechowego. Stosowano: mitochondria (100 μg), NBT (0.07 mg/ml), 30 mM etanol. Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla sześciu odrębnych eksperymentów.

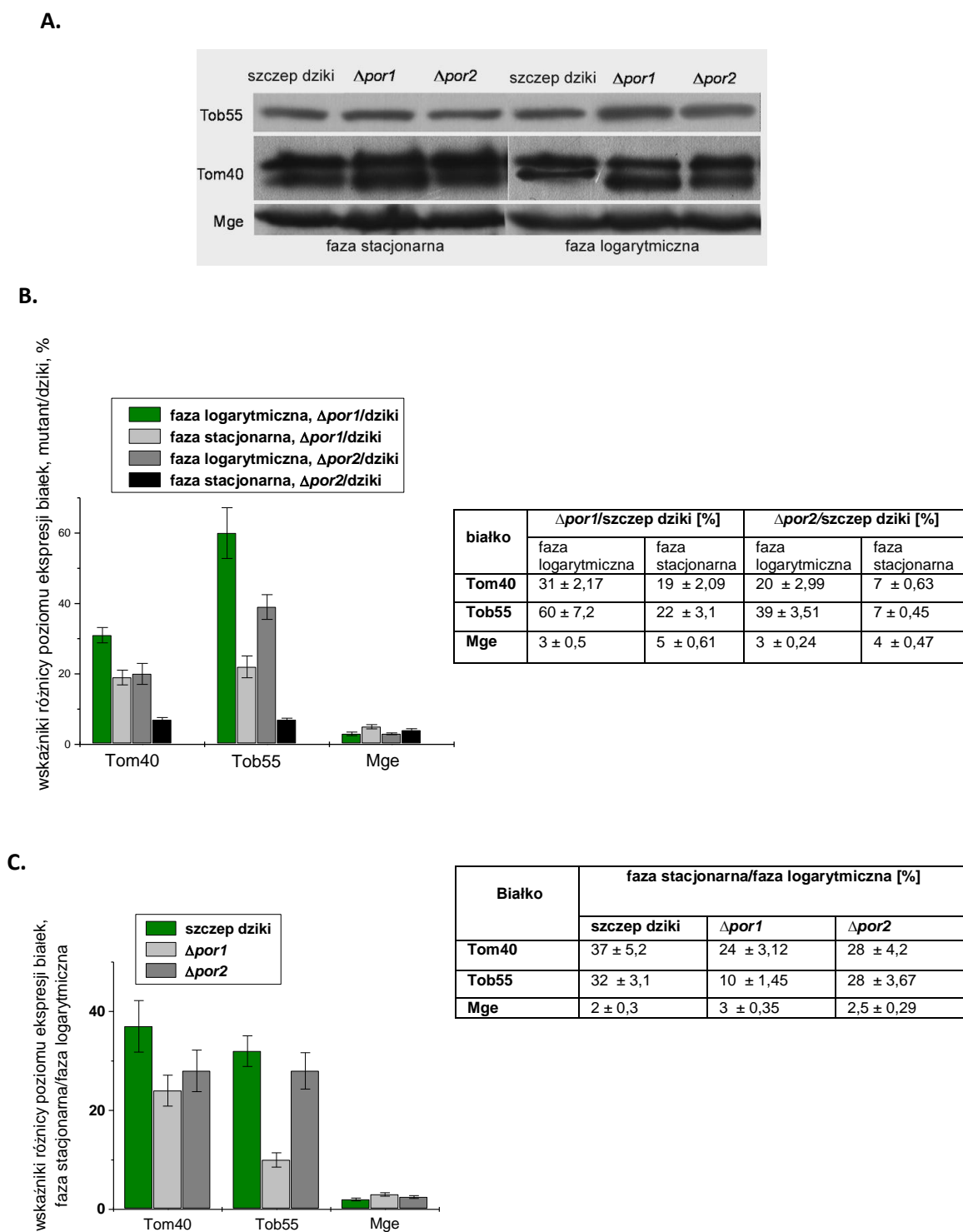
Obliczone szybkości redukcji NBT (rys. 7.3) wskazywały, że dla mitochondriów szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por2$ uwalnianie $O_2^{\cdot-}$ było niskie w logarytmicznej fazie wzrostu i wzrastało w fazie stacjonarnej wzrostu, przy czym słabiej w przypadku mitochondriów $\Delta por2$. Natomiast w przypadku mitochondriów $\Delta por1$ obserwowano wysokie uwalnianie $O_2^{\cdot-}$ w logarytmicznej fazie wzrostu i jego znaczące obniżenie w

fazie stacjonarnej wzrostu. Poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ (w jednostkach umownych) dla badanych mitochondriów wynosił odpowiednio, szczep dziki: $1,5 \pm 0,23$ (faza logarytmiczna wzrostu) i $24 \pm 2,2$ (faza stacjonarna wzrostu), $\Delta por1$: $57,5 \pm 8,1$ (faza logarytmiczna wzrostu) i $1,7 \pm 0,2$ (faza stacjonarna wzrostu), $\Delta por2$: $1,5 \pm 0,17$ (faza logarytmiczna wzrostu) i $9,7 \pm 0,7$ (faza stacjonarna wzrostu). Zatem, dla badanych szczepów drożdży obserwowano korelację między uwalnianiem $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów a zmianami stanów redoks, szczególnie w przypadku cytozolu.

7.4 Stan redoks w obrębie cytozolu jest istotny dla poziomu ekspresji białek tworzących kanały w kompleksach importowych zewnętrznej błony mitochondrialnej.

Dostępne dane (Kmita i Budzińska, 2000; Antos i in., 2001) wskazują, że w przypadku mitochondriów mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ *S. cerevisiae* dochodzi do zwiększonej ekspresji składników kompleksu TOM, w tym białka Tom40 (patrz Wstęp, p. 2.3). Z drugiej strony, u tych szczepów drożdży obserwuje się różnice w wartościach wewnątrzkomórkowych stanów redoks, w tym w obrębie cytozolu (patrz Wyniki, p. 7.2). Postanowiono zatem sprawdzić czy zmiany w poziomie ekspresji białka Tom40 pojawiają się w odpowiedzi na zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu. Zbadano również wpływ stanu redoks w obrębie cytozolu na poziom ekspresji białka Tob55/Sam50 (nazywanego w tej pracy Tob55), wchodzącego w skład kompleksu TOB/SAM (patrz Wstęp, p. 2.3). Oba badane białka wykazują aktywność kanałową i odgrywają kluczową rolę w imporcie białek do mitochondriów. Badania przeprowadzono na mitochondriach izolowanych z komórek w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Jako kontrolę ilościową zastosowano białko Mge, którego poziom ekspresji w mitochondriach badanych szczepów, izolowanych z komórek w różnych fazach wzrostu, nie ulega zmianie.

Jak pokazano na rys. 7.4 A, w przypadku mitochondriów mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w porównaniu z mitochondriami szczepu dzikiego i zależnie od analizowanej fazy wzrostu komórek, występował zwiększony poziom Tom40 i Tob55. Aby obserwowane różnice wyrazić ilościowo, uzyskane wyniki rozdziału elektroforetycznego i następnie immunodetekcji przy pomocy metody „western blot” poddano analizie ilościowej, wykorzystując program ScanPack3 (patrz Metody, p. 6.6.5).



Rys. 7.4

Poziom ekspresji białek Tom40 i Tob55 w mitochondriach szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$, izolowanych z komórek w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. (A) Przykład wyniku „western blot” będącego podstawą analizy ilościowej. (B) Wartości wskaźnika różnicy poziomu ekspresji białek, mutant/szczip dziki. (C) Wartości wskaźnika różnicy poziomu ekspresji białek, faza stacjonarna/faza logarytmiczna dla badanych typów mitochondriów. Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla 10 odrębnych eksperymentów.

Tym sposobem wyznaczono wartości wskaźników różnicy poziomu ekspresji badanych białek między mitochondriami danego mutantu i szczepu dzikiego (rys. 7.4 B). Na podstawie ich wartości stwierdzono, że zwiększenie poziomu ekspresji białek Tom40 i Tob55 było bardziej wyraźne w logarytmicznej fazie wzrostu niż w stacjonarnej fazie wzrostu. Co ciekawe, w przypadku obu mutantów wartość $GSH/(GSH+GSSG)$ wyznaczona dla frakcji cytozolowych (rys. 7.1) wskazywała na silniejsze utlenienie w obrębie tej frakcji w porównaniu ze szczepem dzikim w fazie logarytmicznej i silniejszą redukcję w porównaniu ze szczepem dzikim w przypadku fazy stacjonarnej. Z drugiej strony, kiedy poziom ekspresji Tom40 i Tob55 porównano między stacjonarną i logarytmiczną fazą wzrostu dla danego typu mitochondriów (rys. 7.4. C), najwyższy wzrost ekspresji obserwowano dla szczepu dzikiego, słabszy dla $\Delta por2$ i najniższy dla $\Delta por1$. Zatem, zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu w kierunku zwiększonego utlenienia (rys. 7.1) współwystępują ze zwiększonym poziomem ekspresji białek Tom40 i Tob55.

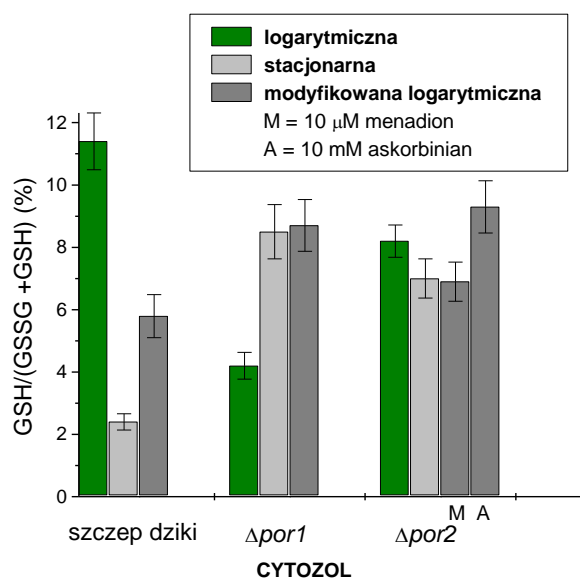
7.5 Dodanie utleniacza lub reduktora podczas wzrostu komórek badanych szczepów drożdży pozwala na uzyskanie fazy logarytmicznej z wartościami wewnątrzkomórkowych stanów redoks odpowiadającymi fazie stacjonarnej

Aby sprawdzić, czy poziom ekspresji białek Tom40 i Tob55 istotnie zależy od stanu redoks w obrębie cytozolu, postanowiono sprawdzić, czy modyfikacje wewnątrzkomórkowego stanu redoks będą wpływać na poziom ekspresji tych białek. W tym celu postanowiono wprowadzić do badań modyfikowaną fazę logarytmiczną wzrostu, w przypadku której wartości stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów odpowiadałyby fazie stacjonarnej wzrostu.

Modyfikowaną fazę logarytmiczną wzrostu uzyskano, wprowadzając utleniacz (10 μ M menadion) lub reduktor (10 mM askorbinian) na początku fazy logarytmicznej, zależnie od badanego szczepu drożdży (patrz Metody, p. 6.1.1) i zmian wewnątrzkomórkowego stanu redoks obserwowanych po przejściu komórek z logarytmicznej do stacjonarnej fazy wzrostu (rys. 7.1 i 7.2). W przypadku szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por2$ modyfikowaną fazę logarytmiczną wzrostu otrzymano w wyniku dodania menadionu, a w przypadku komórek mutantu $\Delta por1$ – askorbinianu.

7.5.1 Stan redoks w obrębie cytozolu w przypadku modyfikowanej fazy logarytmicznej wzrostu odpowiada wartości tego parametru w fazie stacjonarnej

Jak pokazano na rys.7.5, w przypadku frakcji cytozolowej izolowanej z komórek szczepu dzikiego, uzyskano następujące wartości wskaźnika GSH/(GSH+GSSG): $11,4 \pm 0,9\%$ (faza logarytmiczna wzrostu), $2,4 \pm 0,3\%$ (faza stacjonarna wzrostu) i $5,8 \pm 0,7\%$ (modyfikowana faza logarytmiczna wzrostu). Dla frakcji cytozolowej mutantu $\Delta por2$, wartość wskaźnika GSH/(GSH+GSSG) wyznaczona dla modyfikowanej fazy logarytmicznej wzrostu była porównywalna z wartością wyznaczoną dla fazy stacjonarnej, odpowiednio $7 \pm 0,6\%$ i $6,9 \pm 0,6\%$, przy czym obie były niższe od wartości tego wskaźnika, wyznaczonej dla fazy logarytmicznej wzrostu, tj. $8,2 \pm 0,5\%$. Z kolei podanie askorbinianu w przypadku komórek mutantu $\Delta por2$ prowadziło do wzrostu wskaźnika GSH/(GSH+GSSG) do wartości $9,3 \pm 0,8\%$. Natomiast w przypadku frakcji cytozolowej mutantu $\Delta por1$ przejściu z fazy logarytmicznej do stacjonarnej wzrostu, towarzyszył wzrost wartości wskaźnika GSH/(GSH+GSSG) z $4,2 \pm 0,4\%$ do $8,5 \pm 0,9\%$, co udało się odtworzyć w modyfikowanej fazie logarytmicznej wzrostu, dla której wartość wskaźnika GSH/(GSH+GSSG) wynosiła $8,7 \pm 0,8\%$.

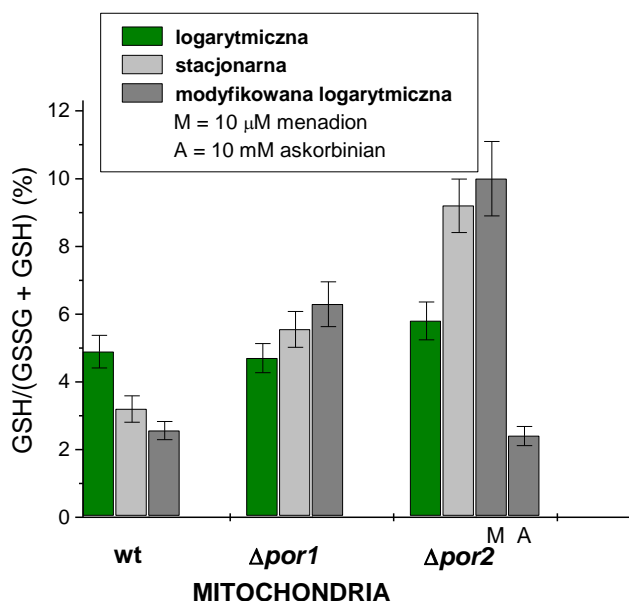


Rys. 7.5

Stan redoks w obrębie frakcji cytozolowej izolowanej z komórek szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w fazie logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej wzrostu. Wartości stanu redoks odpowiadają wartościom wskaźnika GSH/(GSH+GSSG). Stężenia GSH+GSSG i GSH we frakcjach cytozolowych (w nmol/mg białka) wyznaczano według procedury opisanej w Metodach (p. 6.8) w obecności, odpowiednio, reduktazy glutationowej i gliksalazy I. Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla sześciu odrębnych eksperymentów.

7.5.2 Stan redoks w obrębie mitochondriów w modyfikowanej fazie logarytmicznej wzrostu odpowiada wartości tego parametru w fazie stacjonarnej

Na rys. 7.6 przedstawiono wartości wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$ uzyskane dla mitochondriów badanych szczepów drożdży, izolowanych z komórek w różnych fazach wzrostu. W przypadku mitochondriów szczepu dzikiego otrzymano następujące wartości wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$: $4,9 \pm 0,5\%$ (faza logarytmiczna wzrostu), $3,2 \pm 0,4\%$ (faza stacjonarna wzrostu) i $2,6 \pm 0,3\%$ (modyfikowana faza logarytmiczna wzrostu). Dla mitochondriów $\Delta por1$ wartość wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$ przy przejściu komórek z logarytmicznej do stacjonarnej fazy wzrostu wzrastała z $4,7 \pm 0,4\%$ do $5,6 \pm 0,5\%$ i do $6,3 \pm 0,7\%$ w przypadku modyfikowanej fazy logarytmicznej wzrostu. Z kolei dla mitochondriów $\Delta por2$ wartość wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$ wzrastała z $5,8 \pm 0,6\%$ do $9,2 \pm 0,8\%$ przy przejściu komórek z logarytmicznej do stacjonarnej fazy wzrostu i do $10 \pm 1,1\%$ w przypadku modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu.



Rys. 7.6

Stan redoks w obrębie mitochondriów, izolowanych z komórek szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w fazie logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej wzrostu. Wartości stanu redoks odpowiadają wartościom wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$. Stężenia $GSH+GSSG$ i GSH w izolowanych mitochondriach (w nmol/mg białka) wyznaczano według procedury opisanej w Metodach (p. 6.8) Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla 6 odrębnych eksperymentów.

Natomiast podanie askorbinianu w przypadku komórek mutantu $\Delta por2$ prowadziło do wyraźnego obniżenia wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$ do wartości $2,4 \pm 0,28$. Zatem, w przypadku wszystkich badanych szczepów udało się otrzymać

modyfikowaną fazę wzrostu, która pod względem wieku komórek odpowiada fazie logarytmicznej, a pod względem wewnątrzkomórkowych stanów redoks fazie stacjonarnej.

7.6 W komórkach *S. cerevisiae* izoformy białka VDAC uczestniczą w regulacji aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych, zlokalizowanych w cytozolu i w mitochondriach

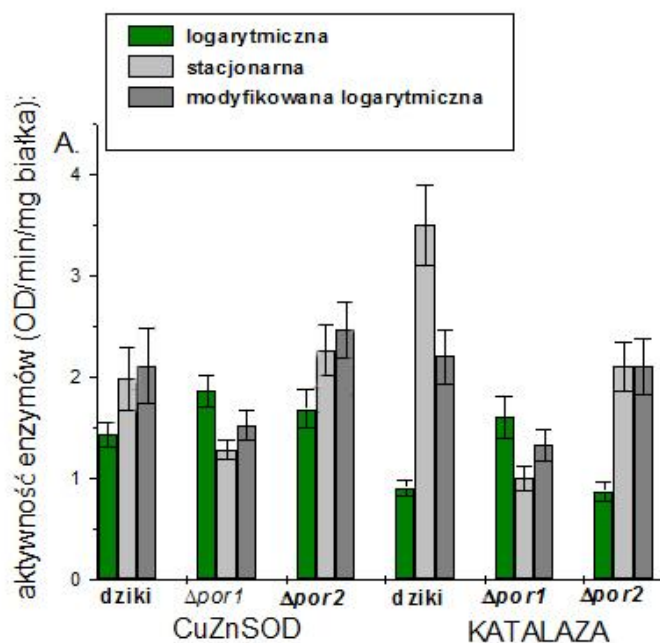
Enzymy antyoksydacyjne chronią komórki przed niebezpiecznymi zmianami stanu redoks i równocześnie uczestniczą w powstaniu ich aktualnie istniejących wartości. Ponieważ stwierdzono, że w komórkach *S. cerevisiae* izoformy białka VDAC wpływają na stan redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów (rys. 7.1, 7.2, 7.5, 7.6), następnym krokiem w prowadzonych badaniach było określenie, czy aktywność podstawowych cytozolowych i mitochondrialnych enzymów antyoksydacyjnych może być również zależna od obecności danej izoformy białka VDAC. W związku z tym wyznaczono aktywność katalazy i CuZnSOD dla frakcji cytozolowych oraz aktywność MnSOD, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej dla mitochondriów izolowanych z komórek badanych szczepów w różnych fazach wzrostu (patrz Metody, p. 6.9).

7.6.1 Aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych zlokalizowanych w cytozolu zmienia się w sposób zależny od fazy wzrostu badanych komórek i stanu redoks

Wartości aktywności obliczone dla CuZnSOD i katalazy przedstawiono na rys. 7. 7. Po porównaniu ich z wartościami stanu redoks w obrębie cytozolu (rys. 7.1 i 7.5) stwierdzono, że zmiana stanu redoks w kierunku utlenienia, współwystępuje ze zwiększeniem aktywności cytozolowych enzymów antyoksydacyjnych, a zmiana w kierunku redukcji, obniża tę aktywność. Dla szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por2$ zwiększający się poziom utlenienia w obrębie cytozolu w fazie stacjonarnej i modyfikowanej fazie logarytmicznej wzrostu, był zgodny ze zwiększającym się poziomem aktywności enzymów antyoksydacyjnych w tych fazach wzrostu. Z kolei w przypadku mutantu $\Delta por1$ wzrost redukcji w obrębie cytozolu w fazie stacjonarnej i modyfikowanej fazie logarytmicznej wzrostu współwystępował z obniżeniem aktywności badanych enzymów antyoksydacyjnych.

W przypadku szczepu dzikiego aktywność CuZnSOD (w OD/min/mg białka) zwiększyła się z $1,43 \pm 0,12$ do $1,9 \pm 0,25$ lub do $2,1 \pm 0,27$ przy przejściu z fazy

logarytmicznej do stacjonarnej lub modyfikowanej fazy logarytmicznej wzrostu. Podobny profil aktywności enzymatycznej został zaobserwowany dla mutantu $\Delta por2$, dla którego aktywność CuZnSOD zwiększyła się z $1,68 \pm 0,19$ do $2,34 \pm 0,31$ lub do $2,52 \pm 0,37$ przy przejściu z fazy logarytmicznej do stacjonarnej lub modyfikowanej fazy logarytmicznej wzrostu. Natomiast w przypadku mutantu $\Delta por1$ aktywność CuZnSOD zmniejszyła się z $1,86 \pm 0,15$ w fazie logarytmicznej wzrostu do $1,28 \pm 0,09$ w fazie stacjonarnej wzrostu i do $1,52 \pm 0,15$ w modyfikowanej fazie logarytmicznej wzrostu. Aktywność katalazy (w OD/min/mg białka) przy przejściu z fazy logarytmicznej do fazy stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu wzrastała z $0,9 \pm 0,08$ do $3,5 \pm 0,39$ i do $2,2 \pm 0,27$ dla szczepu dzikiego, a dla mutantu $\Delta por2$, odpowiednio, z $0,87 \pm 0,09$ do $2,1 \pm 0,24$ i do $2,1 \pm 0,28$. Z kolei dla mutantu $\Delta por1$ aktywność katalazy malała z $1,6 \pm 0,2$ w fazie logarytmicznej do $1 \pm 0,12$ w fazie stacjonarnej i do $1,32 \pm 0,16$ w modyfikowanej fazie logarytmicznej wzrostu.



Rys.7.7

Aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych we frakcji cytozolowej, izolowanej z komórek szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Sposoby pomiaru aktywności badanych enzymów opisano w Metodach, (p. 6.9). Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla dziesięciu odrębnych eksperymentów.

7.6.2 Aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych zlokalizowanych w mitochondriach zmienia się w sposób zależny od fazy wzrostu badanych komórek i stanu redoks

W tab. 2 zebrano wartości aktywności MnSOD, reduktazy glutationowej i peroksydazy glutationowej (w OD/min/mg białka), obliczone dla mitochondriów badanych szczepów drożdży, izolowanych z komórek w różnych fazach wzrostu. Porównanie tych wartości z wartościami stanów redoks wyznaczonymi dla badanych mitochondriów (rys. 7.2 i 7.6) pozwoliło stwierdzić, że aktywność badanych enzymów antyoksydacyjnych współgra ze zmianami stanu redoks w obrębie mitochondriów. Podobnie jak w przypadku enzymów cytozolowych, zmiana stanu redoks w obrębie mitochondriów w kierunku utlenienia, współwystępuje ze wzrostem aktywności enzymów, a zmiana w kierunku redukcji – ze spadkiem.

MnSOD [OD/min/mg białka]

<i>S. cerevisiae</i>	faza logarytmiczna	faza stacjonarna	modyfikowana faza logarytmiczna
Szczep dziki	1,46 ± 0,16	2,96 ± 0,33	3,56 ± 0,39
$\Delta por1$	3,50 ± 0,33	3,10 ± 0,35	2,49 ± 0,28
$\Delta por2$	4,53 ± 0,48	3,47 ± 0,41	2,74 ± 0,32

Reduktaza glutationowa [OD/min/mg białka]

<i>S. cerevisiae</i>	faza logarytmiczna	faza stacjonarna	modyfikowana faza logarytmiczna
Szczep dziki	1,5 ± 0,16	2,6 ± 0,24	3,1 ± 0,34
$\Delta por1$	3 ± 0,34	2 ± 0,28	1,8 ± 0,26
$\Delta por2$	2,6 ± 0,32	2 ± 0,26	2,2 ± 0,3

Peroksydaza glutationowa [OD/min/mg białka]

<i>S. cerevisiae</i>	faza logarytmiczna	faza stacjonarna	modyfikowana faza logarytmiczna
Szczep dziki	1,5 ± 0,16	2,1 ± 0,23	6,2 ± 0,81
$\Delta por1$	5,7 ± 0,74	to 3,6 ± 0,41	3,8 ± 0,42
$\Delta por2$	5,2 ± 0,64	1 ± 0,12	2,3 ± 0,2

Tab.2

Wartości aktywności enzymów antyoksydacyjnych w mitochondriach szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$, izolowanych z komórek w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Sposoby pomiaru aktywności badanych enzymów opisano w Metodach (p. 6.9). Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla dziesięciu odrębnych eksperymentów.

Stan redoks mitochondriów zmieniał się w kierunku utlenienia przy przejściu z fazy logarytmicznej do stacjonarnej lub modyfikowanej fazy logarytmicznej wzrostu tylko w przypadku szczepu dzikiego. Dla mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w tych warunkach

obserwowano wzrost redukcji w obrębie mitochondriów. Zatem, w przypadku badanych szczepów *S. cerevisiae* aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych, zlokalizowanych w cytozolu i mitochondriach, zmienia się w sposób zależny od fazy wzrostu badanych komórek. Dla faz tych obserwowano różnice wewnątrzkomórkowych stanów redoks, w których ustaleniu pośredniczą z kolei izoformy białka VDAC.

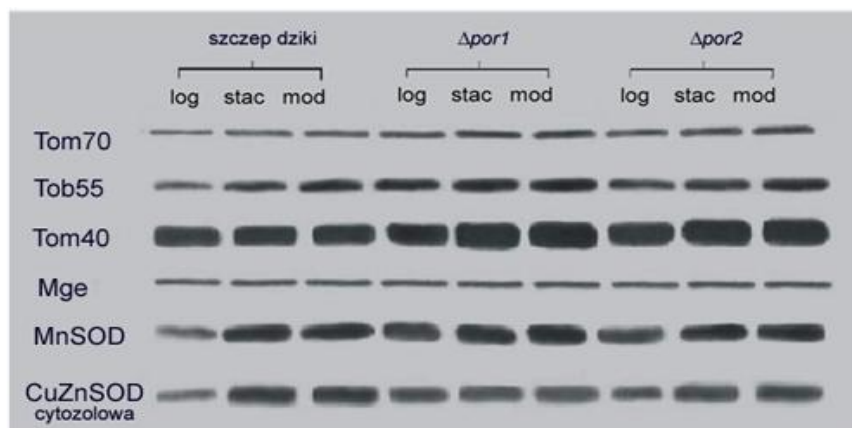
7.7 Modyfikacja wewnątrzkomórkowych stanów redoks prowadzi do zmian ekspresji podjednostek kompleksów importowych zewnętrznej błony mitochondrialnej i dysmutaz ponadtlenkowych

Ponieważ w przypadku analizowanych faz wzrostu badanych komórek drożdży stwierdzono różnice wewnątrzkomórkowych stanów redoks, które z kolei uznano za istotny czynnik, uczestniczący w regulacji ekspresji białek Tom40 i Tob55 w mitochondriach (patrz Wyniki, p. 7.4), postanowiono sprawdzić, czy modyfikacja wewnątrzkomórkowych stanów redoks (patrz Wyniki, p. 7.5) prowadzi będzie do przewidywalnych zmian w poziomie ekspresji białek. W badaniach, obok białek Tom i Tob55, uwzględniono dysmutazy ponadtlenkowe, tj. CuZnSOD (cytozol) i MnSOD (mitochondria), których aktywność wykazywała ścisłą korelację z istniejącymi wewnątrzkomórkowymi stanami redoks (patrz Wyniki, p. 7.6).

Badania przeprowadzono dla frakcji cytozolowych i mitochondriów, izolowanych z komórek w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Jako kontrolę ilościową zastosowano białko Mge, którego poziom ekspresji w mitochondriach badanych szczepów, izolowanych z komórek w różnych fazach wzrostu, nie ulegał zmianie. Aby obserwowane różnice (rys. 7.8) wyrazić ilościowo, uzyskane wyniki rozdziału elektroforetycznego i następnie immunodetekcji przy pomocy metody „western blot” poddano analizie ilościowej, wykorzystując program ScanPack3. Tym sposobem wyznaczono wartości wskaźników różnicy poziomu ekspresji badanych białek między mitochondriami danego mutantu i szczepu dzikiego.

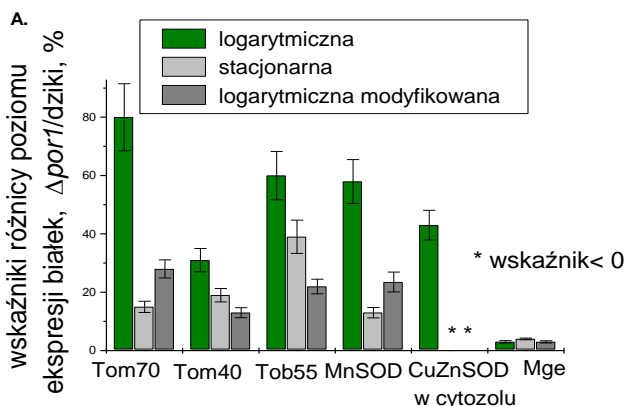
Wyznaczone wartości wskaźników różnicy poziomu ekspresji białek, $\Delta por1$ /szczep dziki (rys. 7.9 A) i $\Delta por2$ /szczep dziki (rys. 7.9 B) wskazują, że poziom ekspresji białek Tom70, Tom40, Tob55 i MnSOD był zwiększony dla mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w porównaniu ze szczepem dzikim, przy czym w przypadku mutantu $\Delta por1$ uzyskano większe różnice ilościowe. Zwiększenie poziomu było wyższe w fazie logarytmicznej wzrostu i zmniejszało się w fazie stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu. Co ciekawe, poziom ekspresji CuZnSOD w cytozolu w przypadku obu mutantów był zwiększony tylko w fazie logarytmicznej. Co więcej,

wartości analizowanych wskaźników wskazują na podobne zmiany ekspresji białek w fazie stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu.

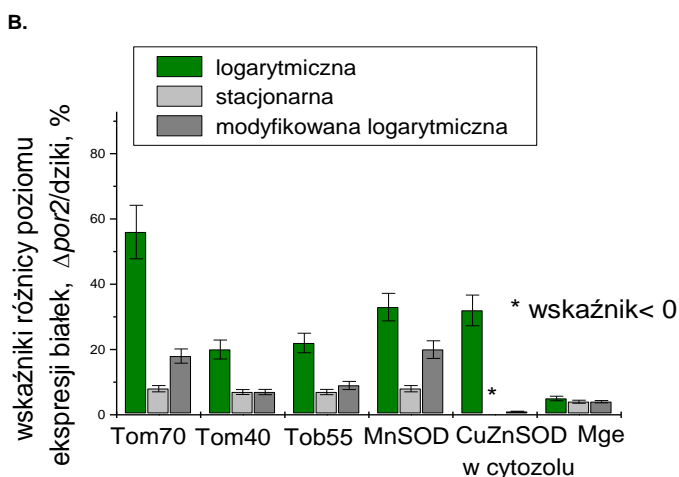


Rys. 7.8
Przykład wyniku „western blot” będącego podstawą analizy ilościowej. Log, stac, mod, to odpowiednio: faza logarytmiczna, faza stacjonarna i modyfikowana logarytmiczna faza wzrostu. Mge, kontrola ilościowa.

Porównanie wartości wskaźników różnicy poziomu ekspresji: faza stacjonarna/faza logarytmiczna oraz modyfikowana faza logarytmiczna/faza logarytmiczna dla analizowanych białek i typów komórek drożdży (rys. 10 A) wskazało, że zmiany w poziomie ekspresji, zachodzące w fazie stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu, są porównywalne. Co więcej, zgodnie z uprzednio uzyskanymi wynikami (rys. 7.4), najwyższy wzrost ekspresji obserwowano dla szczepu dzikiego, słabszy dla $\Delta por2$ i najniższy dla $\Delta por1$. W celu sprawdzenia, czy obserwowane zmiany w ekspresji białek istotnie wykazują korelację ze zmianami stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów, wyznaczono wartości wskaźnika zmiany stanu redoks (rys. 10B). Odpowiadają one ilorazowi wartości GSH/(GSH+GSSG) dla danego przedziału między fazą stacjonarną i logarytmiczną fazą wzrostu oraz modyfikowaną fazą logarytmiczną i logarytmiczną fazą wzrostu. Wartość tego wskaźnika jest równa 1 w przypadku braku zmian stanu redoks między analizowanymi fazami wzrostu, wzrasta powyżej 1 w przypadku zmiany w kierunku redukcji i jest mniejsza od 1 w przypadku zmiany w kierunku utlenienia. Zatem, otrzymane wartości wskaźnika zmian stanu redoks wskazują na silne utlenienie w obrębie cytozolu w fazie stacjonarnej i modyfikowanej fazie logarytmicznej wzrostu w porównaniu z fazą logarytmiczną wzrostu w przypadku szczepu dzikiego, a słabsze utlenienie w przypadku mutantu $\Delta por2$ i redukcję w przypadku mutantu $\Delta por1$.



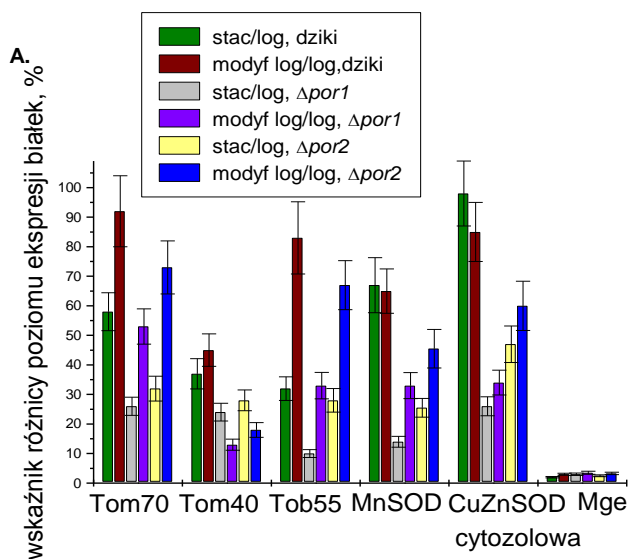
<i>S. cerevisiae</i>	Faza logarytmiczna	Faza stacjonarna	Faza logarytmiczna modyfikowana
Tom70	80 ± 11,5%	15 ± 1,9%	28 ± 3,1%
Tom40	31 ± 4%	19 ± 2,3%	13 ± 1,7%
Tob55	60 ± 8,3%	39 ± 5,7%	22 ± 2,5%
MnSOD	58 ± 7,5%	13 ± 1,8%	23.5 ± 3,4%
CuZnSOD	43 ± 5,1%	-	-



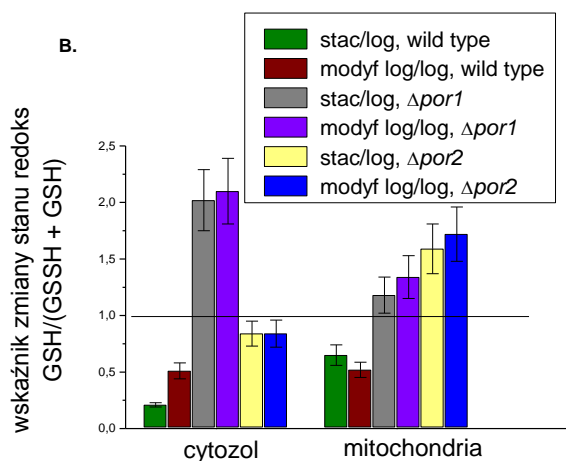
<i>S. cerevisiae</i>	Faza logarytmiczna	Faza stacjonarna	Faza logarytmiczna modyfikowana
Tom70	56 ± 8,2%	8 ± 0,95%	18 ± 2,2%
Tom40	20 ± 2,9%	7 ± 0,82%	7 ± 0,75%
Tob55	22 ± 3%	7 ± 0,81%	9 ± 1,25%
MnSOD	33 ± 4,2%	8 ± 0,96%	20 ± 2,7%
CuZnSOD	32 ± 4,7%	-	-

Rys.7.9

Poziom ekspresji badanych białek w mitochondriach i frakcji cytozolowej szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$, izolowanych z komórek w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Wykres prezentuje wartości wskaźnika różnicy poziomu ekspresji białek, mutant/szczep dziki: (A) $\Delta por1$ /szczep dziki; (B) $\Delta por2$ /szczep dziki. Przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla sześciu odrębnych eksperymentów.



białko	Szczep dziki		$\Delta por1$		$\Delta por2$	
	stac/log	modyf/log	stac/log	modyf/log	stac/log	modyf/log
Tom70	58 ± 6,4	92 ± 12	26 ± 3,1	53 ± 6	32 ± 4,2	73 ± 9
Tom40	37 ± 5,1	45 ± 5,5	24 ± 3	13 ± 1,9	28 ± 3,5	18 ± 2,5
Tob55	32 ± 4	83 ± 12,2	10 ± 1,3	33 ± 4,5	28 ± 4	67 ± 8,3
MnSOD	67 ± 9,3	65 ± 7,5	14 ± 1,85	33 ± 4,4	25,5 ± 3,2	45,5 ± 6,5
CuZnSOD	98 ± 11	85 ± 10	26 ± 3,2	34 ± 4,2	47 ± 6,2	60 ± 8,3
Mge	2 ± 0,22	3 ± 0,35	3 ± 0,4	3,5 ± 0,51	2,5 ± 0,3	3,3 ± 0,4



Rys. 7.10

Wpływ zmian wewnątrzkomórkowych stanów redoks w mitochondriach i frakcjach cytozolowych izolowanych z komórek szczepu dzikiego i mutantów w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu na poziom ekspresji analizowanych białek. (A) Wartości wskaźników różnicy poziomu ekspresji białek, faza stacjonarna/faza logarytmiczna i modyfikowana faza logarytmiczna/faza logarytmiczna. (B) Wartość wskaźnika zmiany stanu redoks dla danego przedziału między fazą stacjonarną i logarytmiczną wzrostu oraz modyfikowaną fazą logarytmiczną i logarytmiczną wzrostu. Wartości stanu redoks odpowiadają wartościom wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$. Stężenia $GSH+GSSG$ i GSH w izolowanych mitochondriach (w nmol/mg białka) wyznaczano według procedury opisanej w Metodach (p. 6.8). Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla sześciu odrębnych eksperymentów.

Z kolei w przypadku mitochondriów przy porównaniu badanych faz wzrostu obserwowano redukcję w przypadku mutantów $\Delta por2$ i $\Delta por1$, silniejszą dla mutantu $\Delta por2$, oraz utlenienie w przypadku szczepu dzikiego. Oznacza to, iż zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu są bardziej istotne dla obserwowanych zmian ekspresji białek, ponieważ zmniejszająca się wartość stanu redoks w obrębie cytozolu współwystępuje ze zwiększeniem ekspresji analizowanych białek. Zatem, kontrolowana zmiana stanu redoks w obrębie cytozolu prowadzi do zmiany ekspresji analizowanych białek zgodnej z przewidywaniami, przy czym dostępne dane nie pozwalają całkowicie wykluczyć roli zmian stanów redoks w obrębie mitochondriów.

7.7.1 Poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów jest istotny dla stanu redoks w obrębie cytozolu i poziomu ekspresji białka Tom40

Ponieważ stwierdzono związek funkcjonalny między stanem redoks w obrębie cytozolu a poziomem ekspresji białek komórkowych, w tym białka Tom40 (patrz Wyniki, p. 7.7), postanowiono sprawdzić, czy istotnie w determinacji stanu redoks w obrębie cytozolu pośredniczyć może uwalnianie $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów (patrz Wyniki, p. 7.3). Zatem, poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów (patrz Metody, p. 6.7) wyznaczono dla mitochondriów izolowanych z komórek szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Postanowiono również sprawdzić czy istnieje korelacja między poziomem uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów a poziomem ekspresji białka Tom40. Dla ilościowego oszacowania poziomu ekspresji tego białka wykorzystano rozdziały elektroforetyczne frakcji mitochondrialnych, ich przeniesienie na błonę nitrocelulozową i immunodetekcję za pomocą swoistego przeciwciała anti-Tom40 (patrz Metody, p. 6.6.5). Przykład wyniku „western blot” będącego podstawą analizy ilościowej przedstawiono na rys. 7.8 i rys. 7.11. Poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów drożdżowych określono, wyznaczając szybkość redukcji NBT przez te mitochondria, przy czym adekwatność pomiaru sprawdzano, podając dysmutazę ponadtlenkową (patrz Wyniki, p. 7.3).

Uzyskane wartości poziomu uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów i poziomu ekspresji białka Tom40 zebrano w tab. 3. Zgodnie z wcześniej przeprowadzonymi pomiarami, obliczone wartości uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów wskazywały, że dla mitochondriów szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por2$ uwalnianie $O_2^{\cdot-}$ było niskie w logarytmicznej fazie wzrostu i wzrastało w fazie stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu, przy czym słabiej w przypadku mitochondriów $\Delta por2$. Natomiast w przypadku mitochondriów $\Delta por1$ obserwowano wysokie uwalnianie $O_2^{\cdot-}$ w logarytmicznej fazie wzrostu i jego znaczące obniżenie w fazie stacjonarnej i

modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu. Zatem, niezależnie od badanego szczepu drożdży, poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów był porównywalny w przypadku fazy stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu i różnił się istotnie od poziomu wyznaczonego dla logarytmicznej fazy wzrostu. Analogiczne różnice między analizowanymi fazami wzrostu uzyskano w przypadku wewnątrzkomórkowych stanów redoks, szczególnie w przypadku cytozolu (rys. 7.5 i 7.6).

szczep	szczep dziki		
faza wzrostu	logarytmiczna	stacjonarna	modyfikowana logarytmiczna
poziom uwalniania anionorodnika [pmol/min/mg białka mito]	6,8±0,8	109,2±14,2	96,7±8,7
Poziom ekspresji Tom40 (jednostki umowne)	148±18	196±23	215±27
szczep	$\Delta por1$		
faza wzrostu	logarytmiczna	stacjonarna	modyfikowana logarytmiczna
poziom uwalniania anionorodnika [pmol/min/mg białka mito]	248,8±34,8	7,8±0,7	23,4±3,3
Poziom ekspresji Tom40 (jednostki umowne)	225±29	279±37	254±31
szczep	$\Delta por2$		
faza wzrostu	logarytmiczna	stacjonarna	modyfikowana logarytmiczna
poziom uwalniania anionorodnika [pmol/min/mg białka mito]	9,6±1,3	42,4±3,4	52,3±5,8
Poziom ekspresji Tom40 (jednostki umowne)	178±19	228± 15	210 ±26

Tab.3

Poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów badanych szczepów drożdży oraz poziom ekspresji Tom40 w mitochondriach. Mitochondria izolowano z komórek szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Inkubację mitochondriów prowadzono w buforze M (0,65 M mannitol, 10 mM Hepes, pH 6,9, 10 mM bufor fosforanowy, pH 6,9, 5 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$ i 0,2% BSA). Poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów (w pmol/min/mg białka mitochondrialnego) wyznaczano na podstawie szybkości redukcji NBT przez mitochondria. Szybkość redukcji NBT mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 560$ nm i w obecności etanolu jako substratu oddechowego. Stosowano: mitochondria (100 μg), NBT (0,07 mg/ml) i 30 mM etanol. W tabeli zebrano wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla sześciu odrębnych eksperymentów.

Oznacza to, iż uwalnianie $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów odgrywa kluczową rolę w determinacji stanów redoks, szczególnie w przypadku cytozolu. Co więcej, poziom

ekspresji białka Tom40, wyznaczony dla badanych mitochondriów izolowanych z komórek w analizowanych fazach wzrostu, wykazuje istotną korelację z poziomem uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów. Stwierdzono bowiem, iż znaczący wzrost w poziomie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów współwystępuje ze zwiększonym poziomem ekspresji białka Tom40, co było szczególnie widoczne w przypadku mitochondriów szczepu dzikiego. Zatem, można założyć, że zwiększone utlenienie w obrębie cytozolu, które pośredniczy w zwiększeniu ekspresji białka Tom40 (oraz innych badanych białek; patrz Wyniki, p. 7), jest wywołane zwiększonym uwalnianiem $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów.

7.7.2 Kompleks TOM uczestniczy w uwalnianiu $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów

Jest faktem dobrze znanym, iż w uwalnianiu $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów uczestniczy kanał VDAC (Han i in., 2003). W związku z tym, pojawiło się pytanie: w jaki sposób $O_2^{\cdot-}$ uwalniany jest z mitochondriów mutantu $\Delta por1$, pozbawionego izoformy VDAC zdolnej do tworzenia kanału? Ponieważ dostępne dane wskazują, iż kompleks TOM może uczestniczyć w transporcie metabolitów (Kmita i Budzińska, 2000; Antos i in., 2001), postanowiono sprawdzić czy kompleks ten może być także miejscem uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów. Wymagało to w pierwszym rzędzie opracowania warunków skutecznej blokady tego kompleksu przez importowane białko. W tym celu wykorzystano białko fuzyjne pb_2 -DHFR (patrz Metody, p. 6.12 oraz 6.13), które importowano do mitochondriów szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$ w warunkach sprzyjających jego zatrzymaniu w obrębie kompleksu TOM (patrz Metody, p. 6.14.5), po czym sprawdzano wpływ zastosowanych warunków na poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów.

7.7.3 Blokada kompleksu TOM hamuje uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów

W celu zablokowania kompleksu TOM import białka pb_2 -DHFR prowadzono w następujących warunkach: (1) klasyczne warunki importu umożliwiające przejściową blokadę kompleksu TOM przez importowane białko; (2) preinkubacja pb_2 -DHFR z metotreksatem (MTX) przed reakcją importu do mitochondriów, co uniemożliwia rozfałdowanie części DHFR i prowadzi do jej zatrzymania na zewnątrz mitochondriów, przy równoczesnej translokacji przez błony mitochondrialne części pb_2 -DHFR, skutkiem czego dochodzi do stabilnej blokady kompleksu TOM oraz kompleksu TIM23; (3) import białka pb_2 -DHFR do mitochondriów, pozbawionych potencjału błony wewnętrznej, co uniemożliwia transport tego białka przez błonę wewnętrzną, skutkiem czego dochodzi do jego translokacji tylko przez błonę zewnętrzną, której towarzyszy blokada kompleksu

TOM. Dla celów opisu wyników przeprowadzonych eksperymentów warunki te opisano za pomocą następujących skrótów: (1) import; (2) import + MTX; (3) import + U, gdzie U oznacza zniesienie potencjału błony wewnętrznej (z ang. uncoupling). Efekt blokady został wyrażony jako procent obliczonego hamowania uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z uwzględnieniem prób kontrolnych, które nie zawierały białka pb₂-DHFR

Jak wynika z danych zebranych w tab. 4, zastosowane warunki blokady kompleksu TOM prowadziły w różnym stopniu do hamowania uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z badanych mitochondriów. Najwyższy poziom hamowania obserwowano dla warunków stabilnej blokady kompleksu TOM i TIM23 (import + MTX), a najniższy w przypadku klasycznego importu (import). Co ciekawe, poziom hamowania zależał od poziomu uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów i wzrastał wraz ze wzrostem uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów (patrz tab. 4). Co więcej, istotna była także obecność funkcjonalnego kanału VDAC. Jego brak zasadniczo zwiększał hamowanie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów w wyniku blokady kompleksu TOM. Zatem, najwyższy poziom hamowania obserwowano dla mitochondriów $\Delta por1$, izolowanych z komórek w logarytmicznej fazie wzrostu. Co ciekawe, porównywalny poziom hamowania, obserwowany dla mitochondriów obu badanych szczepów izolowanych z komórek w stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu, wskazuje na to, iż obie te fazy wykazują istotne podobieństwo warunków wewnątrzkomórkowych. Z drugiej strony, hamowanie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów w wyniku blokady kompleksu TOM obserwowane dla mitochondriów szczepu dzikiego wskazuje na możliwość udziału tego kompleksu w uwalniania $O_2^{\cdot-}$ nawet w obecności funkcjonalnego kanału VDAC.

Poziom hamowania uwalniania $O_2^{\cdot-}$ [%]						
	SZCZEP DZIKI			$\Delta por1$		
	logarytmiczna	stacjonarna	modyfikowana logarytmiczna	logarytmiczna	stacjonarna	modyfikowana logarytmiczna
import	2±0.23	4±0.48	8±1.23	16±1.44	10±1.34	10±0.92
import + MTX	8±1.12	15±2.11	16±2.28	30±2.12	18±1.98	17±1.87
import + U	5±0.65	8±0.63	12±1.67	17±2.38	13±1.77	14±1.32

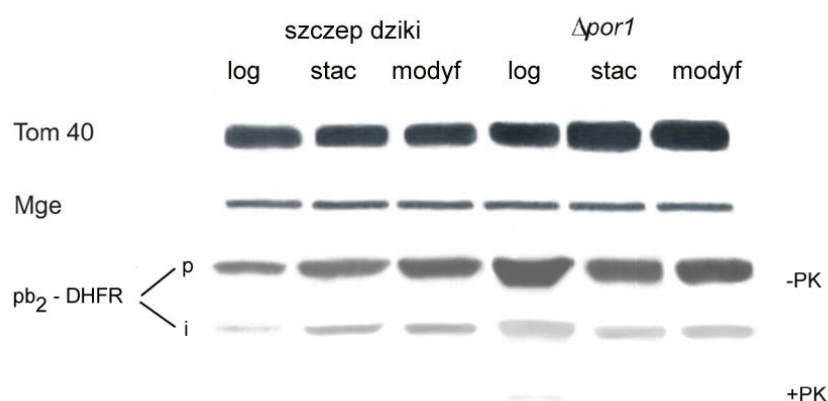
Tab.4

Wpływ zastosowanych warunków blokady kompleksu TOM na poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ przez mitochondria szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$, izolowane z komórek w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Poziom uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów (w pmol/min/mg białka mitochondrialnego) wyznaczano na podstawie szybkości redukcji NBT przez te mitochondria. Szybkość redukcji NBT mierzono spektrofotometrycznie, przy długości fali $\lambda = 560$ nm i w obecności etanolu jako substratu oddechowego. Stosowano: mitochondria (100 μ g), NBT [0.07 mg/ml], etanol [30mM]. W tabeli przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla sześciu odrębnych eksperymentów.

7.7.4 Poziom wiązania białka pb₂-DHFR w warunkach stabilnej blokady kompleksu TOM oraz kompleksu TIM23 (import + MTX) wykazuje korelację z poziomem ekspresji białka Tom40 i poziomem hamowania uwalniania O₂^{•-} z mitochondriów

Biorąc pod uwagę, że najsilniejsze hamowanie uwalniania O₂^{•-} z mitochondriów obserwowano po preinkubacji pb₂-DHFR z metotreksatem (MTX) przed reakcją importu do mitochondriów (import + MTX), postanowiono sprawdzić poziom wiązania tego białka przez badane mitochondria, izolowane z komórek w różnych fazach wzrostu. Jak pokazano na rys. 7.11, związane białko pb₂-DHFR widoczne jest w postaci prekursora (p) i produktu pośredniego (i; ang. intermediate). Wynika to z faktu, iż utrzymywana w stanie pofałdowania część DHFR nie może ulec translokacji przez błony mitochondrialne i tylko zawarta w tym białku część b₂ ulega translokacji przez kompleks TOM i TIM23 i podlega działaniu proteazy zlokalizowanej w matriks mitochondrialnej (patrz Wyniki, p. 7.9.1). Co więcej, podanie proteiny K (+PK) powoduje degradację części DHFR pozostającej na zewnątrz mitochondriów. Zatem, zastosowanie przeciwciała anti-DHFR pozwala na detekcję białka pb₂-DHFR tylko przy braku tej proteiny (-PK).

Analiza wyniku „western blot”, którego przykład przedstawiono na rys. 7.11, wskazuje, że wzrost poziomu ekspresji białka Tom40 w mitochondriach szczepu dzikiego, zależny od analizowanej fazy wzrostu, współwystępował ze zwiększonym poziomem wiązania białka pb₂-DHFR. Z kolei, dla mitochondriów *Δpor1*, mimo niewielkiego wzrostu poziomu ekspresji białka Tom40, pojawiającego się w wyniku przejścia komórek z fazy logarytmicznej wzrostu do fazy stacjonarnej lub modyfikowanej fazy logarytmicznej wzrostu, obserwowano wyraźny spadek poziomu wiązania białka pb₂-DHFR. Zatem, poziom wiązania białka pb₂-DHFR przez badane mitochondria w zastosowanych warunkach blokady kompleksu TOM wykazuje korelację z poziomem hamowania uwalniania O₂^{•-} (patrz tab. 4) i poziomem ekspresji białka Tom40.



Rys.7.11

Korelacja między poziomem ekspresji białka Tom40 i poziomem wiązania białka pb₂-DHFR w warunkach blokady kompleksu TOM i TIM23 (import + MTX) dla mitochondriów szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$, izolowanych z komórek w fazie logarytmicznej, stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu. Mitochondria poddawano elektroforezie SDS-PAGE. Poziom ekspresji białek Tom40 i Mge oraz poziom wiązania białka pb₂-DHFR w warunkach "import + MTX" uwidoczniło się za pomocą swoistych przeciwciał („western blot”). Mge kontrola ilościowa. Na rysunku przedstawiono przykładowy wynik „western blot” będący podstawą analizy ilościowej, uzyskany dla 50 μ g mitochondriów inkubowanych w obecności 1 μ g pb₂-DHFR. Wiązanie pb₂-DHFR w warunkach importu "import + MTX" opisano w „Metodach” (p. 6.14.5). Po inkubacji mitochondria zawieszano w buforze SM (Sacharoza 250 mM, MOPS-KOH 10 mM, pH 7,2) a uzyskaną suspensję dzielono na dwie równe części. Jedną z nich traktowano proteinazą K (250 μ g/ml, 10 min, 0°C) (+PK), podczas kiedy drugą pozostawiano jako kontrolę działania PK (-PK). Wyznaczone wartości poziomów Tom40, Mge i pb₂-DHFR różniły się w granicach nie większych niż 15% (cztery niezależne eksperymenty dla obu typów mitochondriów, izolowanych z komórek w różnej fazie wzrostu). P oraz i oznaczają odpowiednio prekursor i produkt pośredni białka pb₂-DHFR; log, stac, modyf oznaczają odpowiednio logarytmiczną, stacjonarną i modyfikowaną logarytmiczną fazę wzrostu.

7.7.5 Hamowanie uwalniania O₂⁻ z mitochondriów w wyniku blokady kompleksu TOM wymaga integralności strukturalnej kompleksu TOM i zewnętrznej błony mitochondrialnej

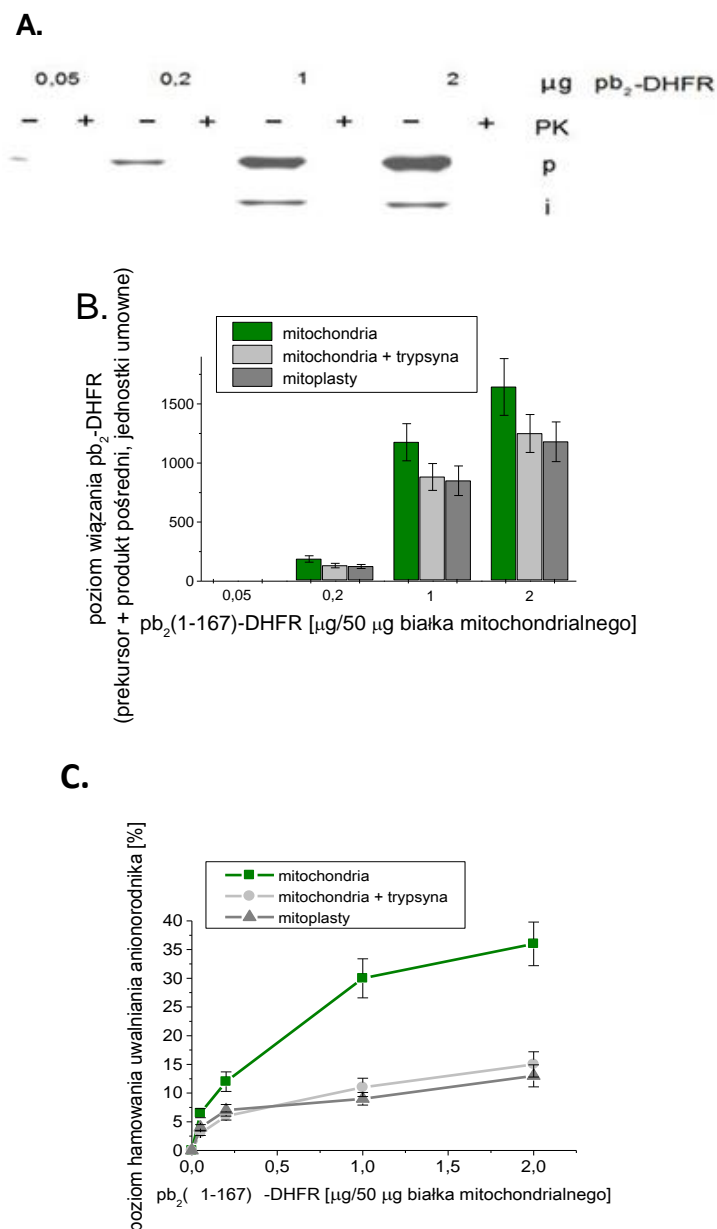
Jak pokazano w tab. 4, najwyższy poziom hamowania uwalniania O₂⁻ w wyniku blokady kompleksu TOM w warunkach „import + X” (patrz Wyniki, p. 7.9.1) obserwowano dla mitochondriów $\Delta por1$, izolowanych z komórek w logarytmicznej fazie wzrostu. Równocześnie dla mitochondriów tych otrzymano najwyższy poziom uwalniania O₂⁻ (tab. 7.4). Dlatego zdecydowano się wykorzystać mitochondria mutantu $\Delta por1$, izolowane z komórek w logarytmicznej fazie wzrostu, do sprawdzenia skutków blokady kompleksu TOM w warunkach „import + MTX” przez wzrastające stężenia pb₂-DHFR. Zastosowano następujące stężenia białka pb₂-DHFR (w μ g na 50 μ g białka mitochondrialnego): 0.05, 0.2, 1 i 2. Jak pokazano na rys. 12 A i B, poziom wiązania

pb₂-DHFR przez mitochondria wzrastał wraz ze wzrostem jego stężenia podczas reakcji importu. Co więcej, wzrastający poziom wiązania pb₂-DHFR przez mitochondria powodował wzrost hamowania uwalniania O₂⁻ (Rys. 12 C).

Aby sprawdzić czy hamowanie uwalniania O₂⁻ było rzeczywiście spowodowane blokadą kompleksu TOM, wykonano takie same pomiary dla mitochondriów, które przed reakcją importu inkubowano w obecności trypsyny. Trypsyna powoduje degradację podjednostek kompleksu TOM pełniących funkcję receptorów, co z kolei powoduje upośledzenie procesu importu białek do mitochondriów, ponieważ podjednostki te są istotne dla rozpoznania białek i zainicjowania ich translokacji przez błonę zewnętrzną (Rapaport i in., 1999; Antos i in., 2001). Zatem, po zadziałaniu trypsyny blokada kompleksu TOM powinna być mniej skuteczna i w związku z tym wiązanie białka pb₂-DHFR przez mitochondria i hamowanie uwalniania O₂⁻ z mitochondriów słabsze. Jak pokazano na rys. 7.12 B, po zadziałaniu trypsyną badane mitochondria wiązały mniejsze ilości białka pb₂-DHFR. Co więcej, spadek poziomu wiązania białka pb₂-DHFR współwystępował z osłabieniem hamowania uwalniania O₂⁻ z mitochondriów przez zastosowane stężenia białka pb₂-DHFR (rys. 7.12 C).

Po zadziałaniu trypsyną poziom hamowania uwalniania O₂⁻ z mitochondriów obniżał się (w %) od 6,5±0,8 do 3±0,4 dla 0,05 µg pb₂-DHFR, z 12 ±1,7 do 6±0,7 dla 1,0 µg pb₂-DHFR, z 30±3,4 do 11±1,6, dla 1,5µg pb₂-DHFR i z 36±3,8 do 15±2,2, dla 2,0 µg pb₂-DHFR (stężenie białka pb₂-DHFR przeliczono na 50 µg białka mitochondrialnego).

W przypadku mitoplastów, dla których przeprowadzono analogiczne pomiary, także obserwowano wiązanie białka pb₂-DHFR, jednak poziom wiązania był słabszy w porównaniu z mitochondriami (rys. 7.12 B), podobnie jak jego wpływ na uwalnianie O₂⁻ (rys. 7.12 C). Po uszkodzeniu ciągłości błony zewnętrznej mitochondriów poziom hamowania uwalniania O₂⁻ spadał (w %) od 6,5±0,8 do 4±0,5 dla 0,05 µg pb₂-DHFR, od 12 ±1,7 do 7±1 przy 0,2 µg pb₂-DHFR, od 30±3 do 9,0±1,1 przy 1 µg pb₂-DHFR i od 36±3,8 do 13±1,9 przy 2 µg pb₂-DHFR (stężenie białka pb₂-DHFR przeliczono na 50 µg białka mitochondrialnego). Zatem, hamowanie uwalniania O₂⁻ z mitochondriów w wyniku blokady kompleksu TOM przez importowane białko wymaga integralności strukturalnej kompleksu TOM i zewnętrznej błony mitochondrialnej.

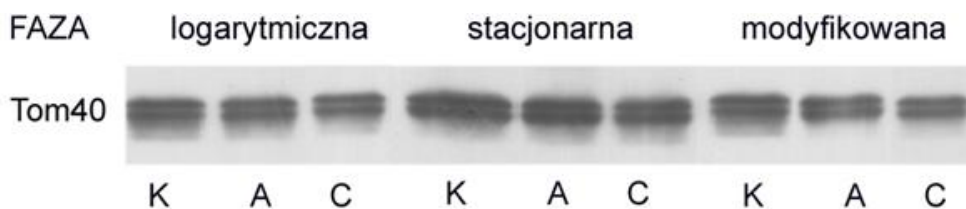


Rys.7.12

Efekt wzrastającego stężenia białka pb₂-DHFR blokującego kompleks TOM w warunkach „import +MTX” na uwalnianie O₂⁻ z mitochondriów mutantu *Δpor1*, izolowanych z komórek w logarytmicznej fazie wzrostu. Po inkubacji z białkiem pb₂-DHFR (patrz Metody, p. 6.14.5), mitochondria (natywne lub traktowane trypsyną) lub mitoplasty, przemywano buforem HS i poddawano elektroforezie SDS-PAGE lub wykorzystywano do przeprowadzenia pomiarów uwalniania O₂⁻ (patrz Metody, p. 6.7). Poziom wiązania pb₂-DHFR uwidoczniano metodą „western blot” i przeciwciałem anti -DHFR. A: Przykład wyniku „western blot”, wykorzystanego w analizach ilościowych. +PK oznacza traktowanie mitochondriów proteinazą K (250 µg/ml, 10 min, 0°C); p oraz i oznaczają odpowiednio formę prekursora i produktu pośredniego białka pb₂-DHFR. B: Poziom wiązania wzrastających stężeń pb₂-DHFR dla mitochondriów (natywnych lub traktowanych trypsyną) i mitoplastów. Opis inkubacji mitochondriów z trypsyną i uzyskania mitoplastów znajduje się w Metodach, odpowiednio, p. 6.14.5 i 6.5. C: Wpływ traktowania trypsyną i uszkodzenia zewnętrznej błony mitochondrialnej (mitoplasty) na poziom hamowania uwalniania O₂⁻ w warunkach blokady kompleksu TOM (import + MTX). Wartości przedstawione w części (B) i (C) zostały uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla trzech odrębnych eksperymentów.

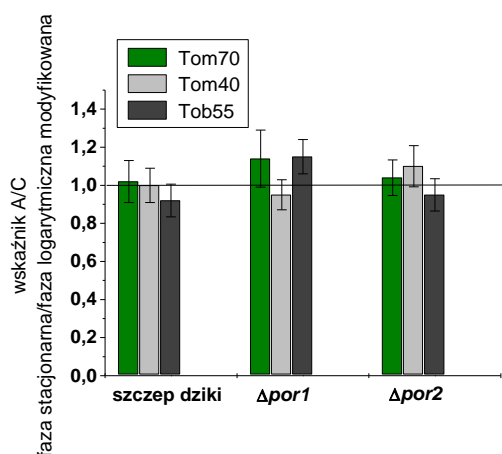
7.8 Działanie α -amanityny i cykloheksymidu zależy od wewnątrzkomórkowych stanów redoks.

W przypadku badanych komórek *S. cerevisiae* stwierdzono, że modyfikacja wewnątrzkomórkowych stanów redoks prowadzi do zmian ekspresji podjednostek kompleksów importowych zewnętrznej błony mitochondrialnej; tj. kompleksów TOM i TOB/SAM (patrz Wyniki, p. 7.7). Ponieważ obserwowane różnice w poziomie ekspresji mogą być skutkiem zmian zachodzących na poziomie transkrypcji i translacji, postanowiono sprawdzić efekt działania inhibitora transkrypcji (α -amanityna) i translacji (cykloheksymid) na poziom ekspresji białek Tom40, Tom70 i Tob55 w mitochondriach szczepu dzikiego i mutantów, izolowanych z komórek w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu (patrz Metody, p. 6.2). Aby obserwowane różnice wyrazić ilościowo, uzyskane wyniki rozdzielów elektroforetycznych i następnie immunodetekcji przy pomocy metody „western blot” poddano analizie ilościowej, wykorzystując program ScanPack3. Na rys. 7.13 przedstawiono przykład wyniku „western blot” będącego podstawą analizy ilościowej, otrzymany dla mitochondriów szczepu dzikiego i białka Tom40. Uzyskane wartości intensywności odpowiednich prążków białkowych wykorzystano do obliczenia wartości współczynnika A/C, będącego ilorzem efektu ilościowego α -amanityny i cykloheksymidu na poziom ekspresji danego białka w mitochondriach, izolowanych z komórek w różnej fazie wzrostu. Wartości współczynników A/C zebrano w tabeli (rys. 7.14). Następnie obliczono wartości wskaźnika A/C, będącego ilorzem współczynników A/C dla danego białka w mitochondriach, izolowanych z komórek w stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu oraz stacjonarnej i logarytmicznej fazie wzrostu (rys. 7.14). W przypadku porównania fazy stacjonarnej wzrostu i modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu, niezależnie od typu mitochondriów i analizowanego białka, wartości wskaźnika A/C były bliskie 1, co wskazywało na podobny efekt ilościowy obu inhibitorów w przypadku tych faz wzrostu. Natomiast przy porównaniu fazy stacjonarnej z logarytmiczną fazą wzrostu, wartości wskaźnika A/C były wyraźnie różne od 1, co wskazywało na różnice w efekcie działania zastosowanych inhibitorów. Ponieważ w przypadku badanych komórek *S. cerevisiae* wartości wewnątrzkomórkowych stanów redoks są porównywalne w stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu i wyraźnie różne od występujących w logarytmicznej fazie wzrostu (patrz Wyniki, p. 7.5), oznacza to, iż wewnątrzkomórkowe stany redoks są istotnym czynnikiem w działaniu α -amanityny i cykloheksymidu.

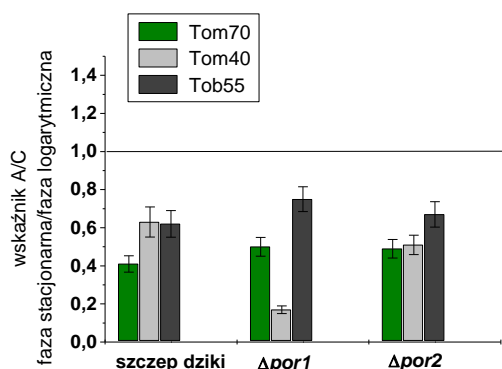


Rys. 7.13

Wpływ α -amanityny i cykloheksymidu na poziom ekspresji białka Tom40 w mitochondriach szczepu dzikiego, izolowanych z komórek w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Komórki inkubowano w obecności α -amanityny (A; 40 μ g/ml) lub cykloheksymidu (C; 7,5 μ g/ml) lub w warunkach kontrolnych (K), po czym przekształcano je w sferoplasty i izolowano mitochondria. Poziom ekspresji białka Tom40 w mitochondriach badano metodą „western blot” z użyciem specyficznego przeciwciała. Przedstawiony wynik był typowy dla pięciu przeprowadzonych rozdzielów elektroforetycznych. Wyznaczone wartości poziomu Tom40 różniły się w granicach nie większych niż 15% dla pięciu odrębnych eksperymentów.



	Wskaźnik A/C		
	Szczep dziki	$\Delta Por1$	$\Delta Por2$
Faza logarytmiczna			
Tom40	1,08±0,11	1,11±0,12	1,6±0,19
Tom70	1,25±0,13	1,11±0,11	1,9±0,23
Tob55	1,1±0,11	1,18±0,21	1,17±0,21
Faza stacjonarna			
Tom40	0,68±0,07	0,19±0,021	0,65±0,071
Tom70	0,47±0,048	0,55±0,058	0,81±0,088
Tob55	0,68±0,07	1,05±0,11	0,93±0,11
Faza logarytmiczna modyfikowana			
Tom40	0,68±0,07	0,2±0,022	0,58±0,07
Tom70	0,51±0,053	0,48±0,052	0,89±0,1
Tob55	0,78±0,08	0,98±0,11	0,83±0,09



Rys.7.14

Efekt α -amanityny i cykloheksymidu na poziom ekspresji białek Tom70, Tom40 i Tob55 w mitochondriach szczepu dzikiego i mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$, izolowanych z komórek w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Efekt inhibitorów przedstawiono w postaci wartości wskaźnika A/C, będącego ilorazem wartości współczynnika A/C, który odpowiada ilorazowi efektu ilościowego α -amanityny i cykloheksymidu na poziom ekspresji danego białka w mitochondriach izolowanych z komórek w różnej

fazie wzrostu. Wartości wskaźnika A/C porównywano dla stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu oraz stacjonarnej i logarytmicznej fazy wzrostu. Komórki inkubowano w obecności α -amanityny (A; 40 μ g/ml) lub cykloheksymidu (C; 7,5 μ g/ml) lub w warunkach kontrolnych (K), po czym przekształcano je w sferoplasty i izolowano mitochondria. (patrz Metody, p.6.2, 6.3 i 6.4) Poziom ekspresji badanych białek w mitochondriach badano metodą „western blot” z użyciem specyficznym przeciwciał. Na rysunku przedstawiono uśrednione wartości wskaźnika A/C (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla pięciu odrębnych eksperymentów

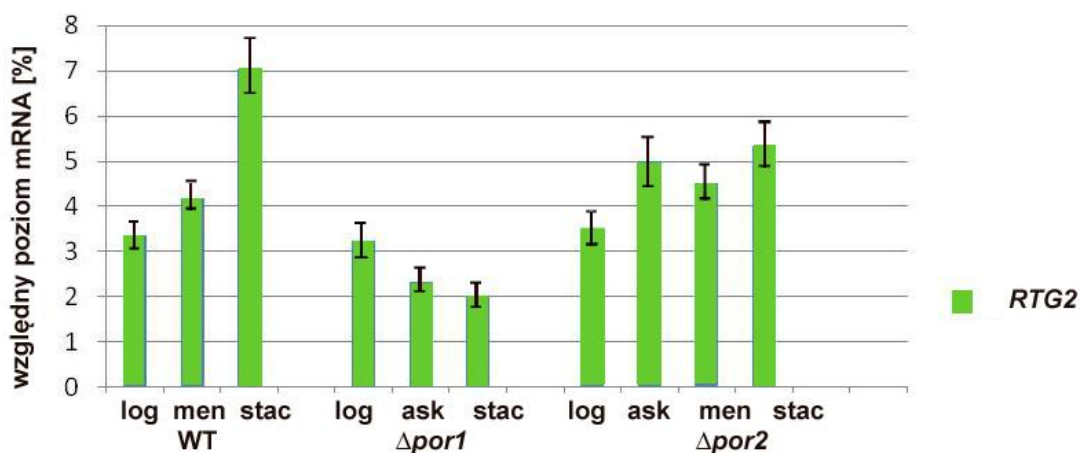
7.9 Kanał VDAC pośredniczy w regulacji poziomu mRNA w sposób zależny oraz niezależny od wewnątrzkomórkowych stanów redoks

Ponieważ zmiany w ilości białka są zwykle poprzedzone zmianami w poziomie kodującego to białko mRNA, a wewnątrzkomórkowy stan redoks może być czynnikiem modyfikującym przebieg transkrypcji (Wyniki, p. 7.10), postanowiono sprawdzić wpływ kontrolowanych zmian wewnątrzkomórkowych stanów redoks w komórkach *S. cerevisiae* (patrz Wyniki, p. 7.5) na poziom ekspresji mRNA kodujących wybrane białka komórkowe. W badaniach tych wykorzystano metodę reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR; patrz Metody, p.6.10.4), nazywaną również ilościową RT-PCR.

7.9.1 Wewnątrzkomórkowy stan redoks jest istotnym czynnikiem, regulującym poziom mRNA

W tabeli 7.6 zebrano białka, dla których badano zależność poziomu kodujących je mRNA od wewnątrzkomórkowych stanów redoks. Tabela ta zawiera również krótką informację o lokalizacji i funkcji tych białek oraz wpływie stanu redoks na poziom kodujących je mRNA. Porównanie wyznaczonych poziomów badanych mRNA z poziomem mRNA genu referencyjnego pozwoliło na uzyskanie wartości tzw. względnych poziomów mRNA. Porównanie wartości względnych poziomów mRNA między szczepem dzikiem i mutantem $\Delta por1$ pozwoliło z kolei wnioskować o istnieniu zależności między poziomem mRNA i wewnątrzkomórkowym stanem redoks. Natomiast włączenie do analiz wyników uzyskanych dla mutantu $\Delta por2$ pozwoliło wnioskować o roli mitochondrialnego lub cytozolowego stanu redoks, ponieważ w przypadku tego mutantu zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów nie są skoordynowane (patrz Wyniki, p. 7.2 i 7.5). Przykład danych, wykorzystanych w analizach (dla mRNA kodującego białko Rtg2), przedstawiono na rys. 7.15. Jako gen referencyjny wykorzystano *MGE*, ponieważ poziom ekspresji białka Mge nie zmienia się w różnych warunkach wewnątrzkomórkowego stanu redoks (patrz Wyniki, p. 7.4). Dla przykładowego genu *RTG2*, kodującego białko uczestniczące w komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami (Aragon i in., 2006), u szczepu dzikiego w momencie przejścia komórek z logarytmicznej do stacjonarnej lub modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu obserwowano wzrost względnego poziomu mRNA. Podobny efekt uzyskano dla komórek $\Delta por2$. Natomiast w przypadku komórek $\Delta por1$ przejściu z logarytmicznej do stacjonarnej lub modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu towarzyszył spadek względnego poziomu mRNA. Biorąc pod uwagę zmiany wewnątrzkomórkowych stanów redoks (patrz Wyniki, p. 7.5), można stwierdzić, iż

zmiana wewnątrzkomórkowego stanu redoks w kierunku utlenienia zwiększa względny poziom mRNA kodującego białko Rtg2 (porównanie szczep dziki/mutant $\Delta por1$), przy czym analiza zmian stanów redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów komórek $\Delta por2$, obserwowanych po podaniu menadionu lub askorbinianu (porównanie szczep dziki/mutant $\Delta por2$), pozwala wnioskować, iż utlenienie zachodzące w obrębie cytozolu ma większe znaczenie niż zachodzące w mitochondriach (tab. 7.6). Analogiczne obliczenia, skorelowane ze zmianami wewnątrzkomórkowych stanów redoks, przeprowadzono dla pozostałych badanych mRNA, a uzyskane wnioski zebrano w tab. 6. Istotny wpływ stanu redoks w obrębie cytozolu na względny poziom mRNA obserwowano w przypadku genów *AQY1*, *MDM10*, *MKS1*, *POR1*, *TOB38*, *TOB55*, *SOD1*, *SOD2*, *TIM22*, *TOM40*. Natomiast wpływ zmian mitochondrialnego stanu redoks na względny poziom mRNA obserwowano w przypadku *AQY1*, *MDM10*, *MKS1*, *POR1*, *TOB55*, *SOD1*, *SOD2*, *TIM22*, *TIM23*, *TOM40*. Zatem wewnątrzkomórkowy stan redoks jest istotnym czynnikiem, regulującym ekspresję białek mitochondrialnych o różnej funkcji i lokalizacji, jak również białek zlokalizowanych w innych przedziałach komórkowych.



Rys.7.15

Wartości względnych poziomów mRNA kodującego białko Rtg2 w zróżnicowanych warunkach stanu redoks w komórkach szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$. Poziom ekspresji mRNA kodujących białka Rtg2 i Mge (gen referencyjny) wyznaczono za pomocą ilościowej RT – PCR (patrz Metody, p. 6.10.4) dla komórek w logarytmicznej (log), stacjonarnej (stac) i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu. Fazę modyfikowaną uzyskano poprzez dodanie do wczesnej fazy logarytmicznej hodowli 10 μ M menadionu (men) lub 10 mM askorbinianu (ask), zależnie od badanego szczepu. W przypadku komórek $\Delta por2$ zastosowano również podanie askorbinianu, wywołującego modyfikacje stanów redoks odmienną od obserwowanej w fazie stacjonarnej wzrostu. Względny poziom mRNA szacowano za pomocą programu SDS 2.3 (Applied Biosystems). Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla dziewięciu odrębnych reakcji RT-PCR (3 powtórzenia techniczne oraz 3 powtórzenia biologiczne). Znaczenie statystyczne testowano przy poziomie istotności $\alpha = 0,01$ (test *t*).

Gen	funkcja	lokalizacja	Wewnątrz- komórkowy stan redoks ($\Delta por1/wt$)	cytozol ($\Delta por2$)	mitochondria ($\Delta por2$)
AQY1	Kanał wodny	błona komórkowa, retikulum endoplazmatyczne	x	+	+
AQY2	Kanał wodny	błona komórkowa, retikulum endoplazmatyczne			
IDH1	Dehydrogenaza izocytrynianowa	matriks mitochondrialna			
MDM10	Białko współdziałające z kompleksem TOB/SAM; import białka do mitochondriów	zewnątrzna błona mitochondrium	x	++	+
MKS1	Komunikacja jądro/mitochondria	cytozol	x	+	+
POR1	Izoforma VDAC tworząca kanał	zewnątrzna błona mitochondrium	x	+	++
POR2	Izoforma VDAC nie- tworząca kanału	zewnątrzna błona mitochondrium	x		
RTG2	Komunikacja jądro/mitochondria	cytozol	x	++	+
SAM35/ TOB38	Podjednostka kompleksu TOB/SAM; import białka do mitochondriów	zewnątrzna błona mitochondrium	x	+	
SAM50/ TOB55	Podjednostka kompleksu TOB/SAM; import białka do mitochondriów	zewnątrzna błona mitochondrium	x	+	++
SOD1	Dysmutaza anionorodnika ponadtlenkowego, cynkowo - miedziowa	przestrzeń międzybłonowa mitochondriów, cytozol	x	+	+
SOD2	Dysmutaza anionorodnika ponadtlenkowego, manganowa	matriks mitochondrialna	x	+	+
SSC1	Białko opiekuńcze; import białka do mitochondriów	matriks mitochondrialna	x		
TIM22	Podjednostka kanałowa kompleksu TIM22; import białka do mitochondriów	wewnętrzna błona mitochondrium	x	+	++

<i>TIM23</i>	Podjednostka kanałowa kompleksu TIM23; import białka do mitochondriów	wewnętrzna błona mitochondrium	x		+
<i>TOM40</i>	Podjednostka kanałowa kompleksu TOM; import białka do mitochondriów	zewnątrzna błona mitochondrium	x	+	+
<i>TOM70</i>	Podjednostka kompleksu TOM; import białka do mitochondriów	zewnątrzna błona mitochondrium	x		
<i>ZWF1</i>	Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa	retikulum endoplazmatyczne	x		
<i>MGE</i>	Białko współdziałające z białkiem opiekuńczym Ssc1; import białka do mitochondriów Gen referencyjny	matriks mitochondrialna			

Tab. 5

Wyniki analizy wpływu wewnątrzkomórkowych stanów redoks na względny poziom badanych mRNA. W czwartej kolumnie zaznaczono obserwowane różnice w ekspresji w przypadku łącznej zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów (wewnątrzkomórkowy stan redoks ($\Delta por1/wt$)). W kolumnie piątej zaznaczono różnice współwystępujące ze zmianami cytozolowego stanu redoks (cytozol, $\Delta por2$), a w kolumnie szóstej ze zmianami mitochondrialnego stanu redoks (mitochondria, $\Delta por2$). Poziom ekspresji mRNA wyznaczano za pomocą ilościowej RT-PCR (patrz Metody, p. 6.10.4) dla komórek w logarytmicznej, stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu. Fazę modyfikowaną uzyskano poprzez dodanie do wczesnej fazy logarytmicznej hodowli 10 μ M menadionu lub 10 mM askorbinianu, zależnie od badanego szczepu. W przypadku komórek $\Delta por2$ zastosowano również podanie askorbinianu, wywołującego modyfikację stanów redoks odmienną od obserwowanej w fazie stacjonarnej wzrostu (patrz Wyniki, p. 7.5). W tabeli przedstawiono skrótowo wnioski sformułowane na podstawie uśrednionych wartości względnych poziomów mRNA (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla dziewięciu odrębnych reakcji RT-PCR (3 powtórzenia techniczne, 3 powtórzenia biologiczne). Przy opisie funkcji i lokalizacji wykorzystano stronę internetową www.yeastgenome.org.

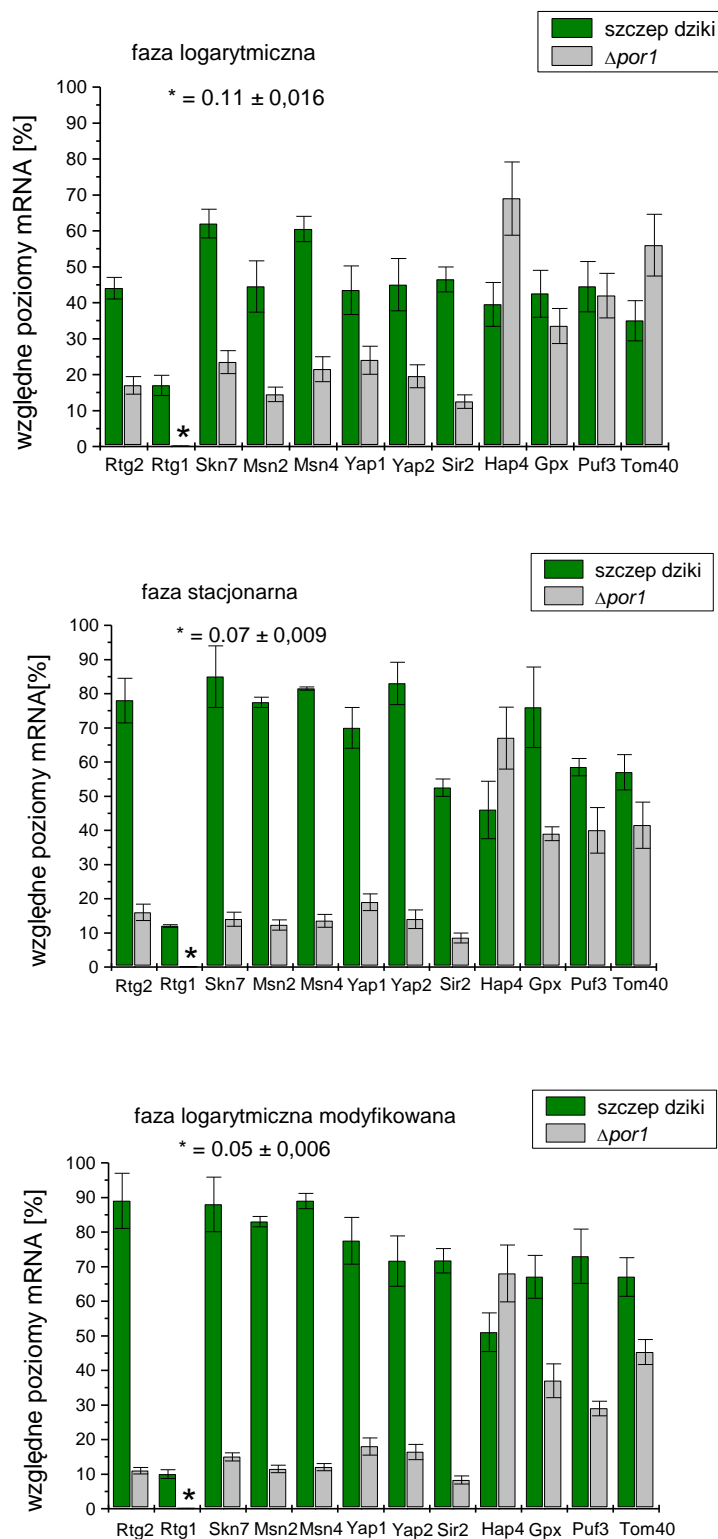
7.9.2 W regulacji poziomu mRNA, kodujących białka jądrowe wrażliwe na zmiany wewnątrzkomórkowych stanów redoks, w tym czynniki transkrypcyjne, oraz białka uczestniczące w komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami, kluczową rolę odgrywa funkcja kanałowa białka VDAC

Jak stwierdzono powyżej (patrz Wyniki, p. 7.11.1), wewnątrzkomórkowy stan redoks odgrywa istotną rolę w regulacji poziomu mRNA kodującego białko Rtg2, uczestniczące w komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami. Co więcej, zgodnie z opublikowanymi danymi (Aragon i in., 2008), w przypadku komórek *S. cerevisiae* modyfikacja wewnątrzkomórkowych stanów redoks prowadzi do zmian poziomu mRNA kodujących jądrowe czynniki transkrypcyjne, uczestniczące w adaptacji do zmian stanów redoks (Mns2 i Mns4), oraz białko Rtg2. Ponieważ kanał VDAC odgrywa istotną rolę w determinacji wewnątrzkomórkowych stanów redoks (patrz

Wyniki, p. 7.2 i 7.5), następnym krokiem było określenie wpływu obecności izoformy VDAC1, tworzącej funkcjonalny kanał w mitochondriach *S. cerevisiae*, na poziom transkryptów białek jądrowych, uczestniczących w adaptacji do zmian wewnątrzkomórkowych stanów redoks, w tym czynników transkrypcyjnych, oraz białek uczestniczących w komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami.

W badaniach uwzględniono geny *RTG1* i *RTG2*, kodujące białka uczestniczące w komunikacji jądro komórkowe – mitochondria, geny *MSN2*, *MSN4*, *YAP2*, *SKN7* i *YAP1*, kodujące jądrowe czynniki transkrypcyjne, uczestniczące w adaptacji do zmian stanów redoks, oraz gen *SIR2*, kodujący jądrowy czujnik stanu redoks (Butow i in., 2004; Liu i in., 2005; Cabisco i in., 2000; Drakulic i in., 2005). Jako kontrolne geny zastosowano: *HAP4*, kodujący jądrowy czynnik transkrypcyjny, kontrolujący geny metabolizmu tlenowego, *GPX*, kodujący cytoplazmatyczny czujnik stanu redoks, *PUF3* (kodujący białko, kontrolujące transport i stabilność mRNA, kodujących białka importowane do mitochondriów) oraz *TOM40*, kodujący białko Tom40 (Liu i in., 2005; García-Rodríguez i in., 2007; Dolezal i in., 2007; Bohnert i in., 2007; Mokranjac i in., 2009). Jako geny referencyjne zastosowano gen *ACT1*, kodujący aktynę, powszechnie stosowany w badaniach ilościowej analizy poziomu transkryptów w komórkach *S. cerevisiae* (Teste i in., 2009) i *MGE* (patrz Wyniki, p. 7.11.1). Względne poziomy mRNA oszacowane przy wykorzystaniu *ACT1* i *MGE* były porównywalne. Dlatego do obliczeń zostały użyte oba geny referencyjne.

Reakcje ilościowej RT-PCR przeprowadzono dla komórek szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$ w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu (patrz Wyniki, p. 7.5). Jak pokazano na rys. 7.16, niezależnie od analizowanej fazy wzrostu komórek, względny poziom mRNA kodujących białka Rtg1, Rtg2, Skn7, Msn2, Msn4, Yap1, Yap2 i Sir2 był wyraźnie obniżony w przypadku mutantu $\Delta por1$, w porównaniu z genami, kodującymi białka Hap4, Gpx, Puf3 i Tom40. Obniżony poziom transkryptu był szczególnie widoczny w przypadku czynnika transkrypcyjnego Rtg1. Co więcej, obniżony względny poziom mRNA obserwowano zarówno w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej, jak i stacjonarnej fazie wzrostu, co oznacza, że obserwowane zmiany nie były przejściowe i związane z daną fazą wzrostu, ale były rezultatem braku izoformy VDAC1. Z drugiej strony, zwiększony względny poziom mRNA kodującego białko Hap4, obserwowany dla komórek $\Delta por1$, świadczy o tym, że obniżony względny poziom transkryptów nie jest typową cechą mutantu $\Delta por1$.



Rys.7.16

Różnice względnych poziomów mRNA, kodujących analizowane białka w komórkach szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$, w logarymicznej, stacjonarnej i modyfikowanej logarymicznej fazie wzrostu. W reakcjach ilościowej RT-PCR (patrz Metody, p. 6.10.4) jako geny referencyjne wykorzystano *ACT1* i *MGE*. Względny poziom mRNA określono z wykorzystaniem programu SDS 2.3 (Applied Biosystems). Na rysunku przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla dziewięciu odrębnych reakcji RT-PCR (3 powtórzenia techniczne, 3 powtórzenia biologiczne). Znaczenie statystyczne testowano przy poziomie istotności $\alpha = 0,01$ (test *t*).

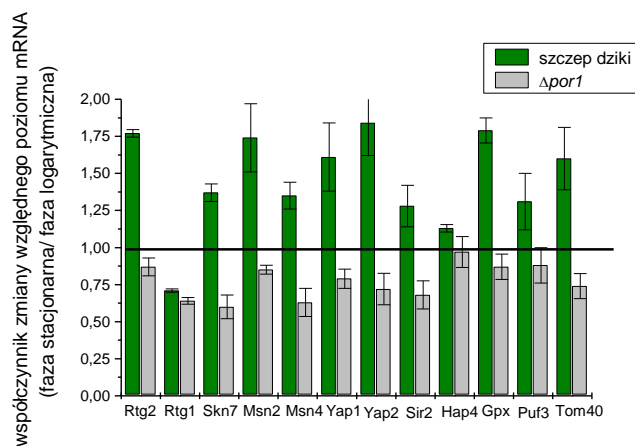
Co istotne, niezależnie od typu badanych komórek, względne poziomy mRNA, wyznaczone dla modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu, były bardziej zbliżone do uzyskanych dla stacjonarnej fazy wzrostu niż logarytmicznej fazy wzrostu, co wskazuje na ważną rolę wewnątrzkomórkowych stanów redoks w mechanizmie obserwowanych zmian. Podsumowując, brak izoformy VDAC1, tworzącej funkcjonalny kanał w mitochondriach *S. cerevisiae*, prowadzi prawdopodobnie do zmian wewnątrzkomórkowych stanów redoks i – w konsekwencji – do wyraźnego obniżenia względnych poziomów mRNA, kodujących białka uczestniczące w komunikacji jądro komórkowe/mitochondria (Rtg1, Rtg2) oraz białka jądrowe, pełniące funkcję czujnika stanów redoks (Sir2) i uczestniczące w przystosowaniu do zmian stanów redoks (Skn7, Msn2, Msn4, Yap1, Yap2).

7.9.3 Białko VDAC1 wpływa na poziom transkryptów poprzez mechanizm zależny, jak i niezależny od wewnątrzkomórkowych stanów redoks

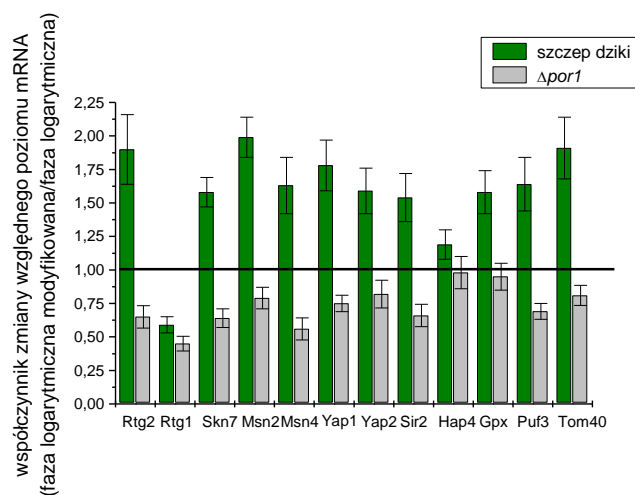
Jak wykazano wcześniej (patrz Wyniki, p. 7,2 i 7,5), komórki szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$ w analizowanych fazach wzrostu różnią się wewnątrzkomórkowym stanem redoks. Aby zweryfikować hipotezę, zakładającą związek między wewnątrzkomórkowym stanem redoks i względnym poziomem mRNA kodujących badane białka (patrz Wyniki, p. 7.11. 2), porównano zmiany względnego poziomu mRNA i wewnątrzkomórkowych stanów redoks dla komórek szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$ w różnych fazach wzrostu. Na rys. 7.17 A i B przedstawiono obliczone wartości współczynnika zmiany względnego poziomu mRNA między stacjonarną i logarytmiczną fazą wzrostu oraz między modyfikowaną logarytmiczną i logarytmiczną fazą wzrostu. Uzyskane wartości współczynnika zmiany względnego poziomu mRNA wskazywały wyraźne zmiany względnego poziomu mRNA dla obu badanych szczepów, z wyjątkiem mRNA, kodującego białka Rtg1 i Hap4. Wartość współczynnika poniżej 1 oznacza obniżenie względnego poziomu mRNA podczas stacjonarnej lub modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu w porównaniu z logarytmiczną fazą wzrostu, podczas gdy wartość współczynnika powyżej 1 oznacza zwiększenie względnego poziomu mRNA podczas stacjonarnej lub modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu w porównaniu z logarytmiczną fazą wzrostu. Zatem, w przypadku białek Sir2, Skn7, Msn2, Msn4, Yap1, Yap2, Gpx, Puf3 i Tom40 obserwowano spadek względnego poziomu kodujących te białka mRNA w komórkach mutantu $\Delta por1$ i wzrost w komórkach szczepu dzikiego. Natomiast dla białek Rtg1 i Hap4, niezależnie od typu badanych komórek,

obserwowano spadek względnego poziomu mRNA w przypadku Rtg1 i wzrost w przypadku Hap4.

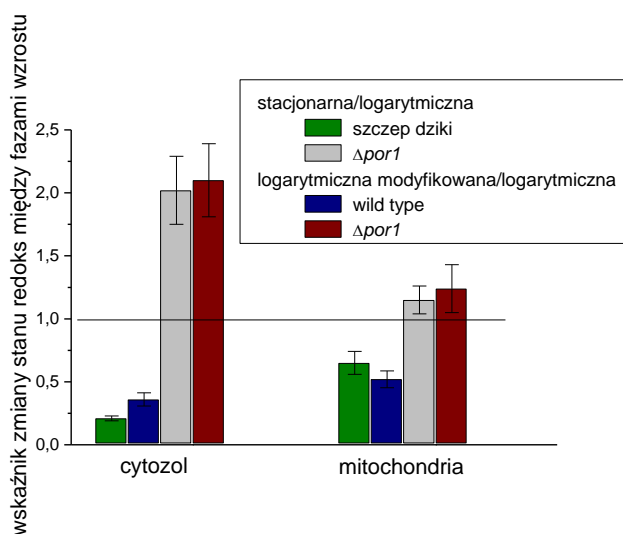
A.



B.



C.



Rys.7.17

Wpływ zmian wewnątrzkomórkowych stanów redoks na względny poziom mRNA kodujących analizowane białka w komórkach szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$ w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu: (A) Wartości współczynnika zmiany względnego poziomu mRNA między stacjonarną i logarytmiczną fazą wzrostu. (B) Wartości współczynnika zmiany względnego poziomu mRNA między modyfikowaną logarytmiczną i logarytmiczną fazą wzrostu. (C) Wartości wskaźnika zmiany stanu redoks między fazami wzrostu. W obliczeniach wartości współczynnika zmiany względnego poziomu mRNA wykorzystano dane przedstawione na rys. 7. 16. Wartości wskaźnika zmiany stanu redoks między fazami wzrostu obliczono według procedury opisanej w opisie rys. 10.

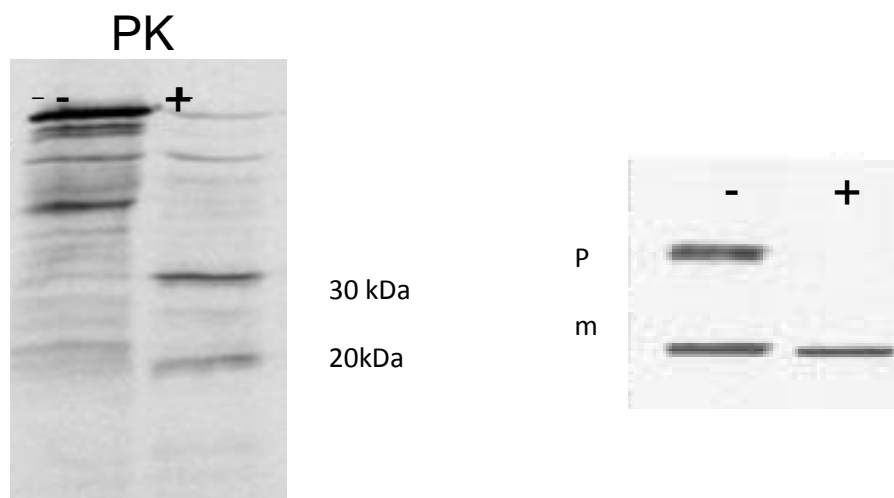
Następnym krokiem było zbadanie współzależności między zmianami względnych poziomów transkryptów i zmianami stanów redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów. W tym celu wyznaczono wartości wskaźnika zmiany stanu redoks (rys. 7.17 C). Jak wyjaśniono wcześniej (patrz Wyniki, p. 7.7) odpowiadają one ilorazowi wartości $GSH/(GSH+GSSG)$ dla danego przedziału między fazą stacjonarną i logarytmiczną wzrostu oraz modyfikowaną fazą logarytmiczną i logarytmiczną fazą wzrostu. Wartość tego wskaźnika jest równa 1 w przypadku braku zmian stanu redoks między analizowanymi fazami wzrostu, wzrasta powyżej 1 w przypadku zmiany w kierunku redukcji i jest mniejsza od 1 w przypadku zmiany w kierunku utlenienia. Obniżenie względnych poziomów mRNA (rys. 7.17 A, B), obserwowane dla komórek $\Delta por1$, odpowiadało wskaźnikowi zmiany stanu redoks oszacowanemu dla cytozolu, ale nie dla mitochondriów. Dla komórek szczepu dzikiego wzrost względnego poziomu mRNA (rys. 7.17 A, B) także współwystępował ze wskaźnikiem zmiany stanu redoks oszacowanym dla cytozolu, przy czym otrzymane wartości wskaźnika zmiany stanu redoks w obrębie mitochondriów nie pozwalają wykluczyć wpływu tego parametru na obserwowane zmiany względnego poziomu mRNA. Co istotne, w przypadku mRNA kodujących białka Rtg1 i Hap4 nie zaobserwowano wpływu zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów. Można zatem założyć, że w przypadku tych mRNA obecność białka VDAC1 wpływała na ich względny poziom w sposób niezależny od zmian wewnątrzkomórkowego stanu redoks. Z kolei w przypadku mRNA, kodujących Rtg2, Sir2, Skn7, Msn2, Msn4, Yap1, Yap2, Gpx, Puf3 i Tom40 stwierdzono wzrost względnego poziomu w wyniku utlenienia, głównie w obrębie cytozolu.

7.10 Import białka do mitochondriów zależy od wewnątrzkomórkowych stanów redoks

Jest faktem dobrze znanym, że precyzyjna kontrola procesu importu białka do mitochondriów zapewnia dostosowanie przebiegu tego procesu do istniejących warunków. Ponieważ stwierdzono, że kontrolowane zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów prowadzić mogą do zmian w ekspresji szeregu białek komórkowych, w tym białek mitochondrialnych, postanowiono sprawdzić, czy mogą one również wywołać zmiany w poziomie i szybkości importu białek do mitochondriów. W tym celu przeprowadzono reakcje importu dwóch białek: Tob55 i białka fuzyjnego Su9-DHFR (białko fuzyjne, składające się z 66 aminokwasów końca aminowego podjednostki 9 syntazy ATP *Neurospora crassa* i mysiej reduktazy dihydrofolianu, Pfanner i in., 1987, patrz Metody, p. 6.14.1 – 6.14.3) do mitochondriów szczepu

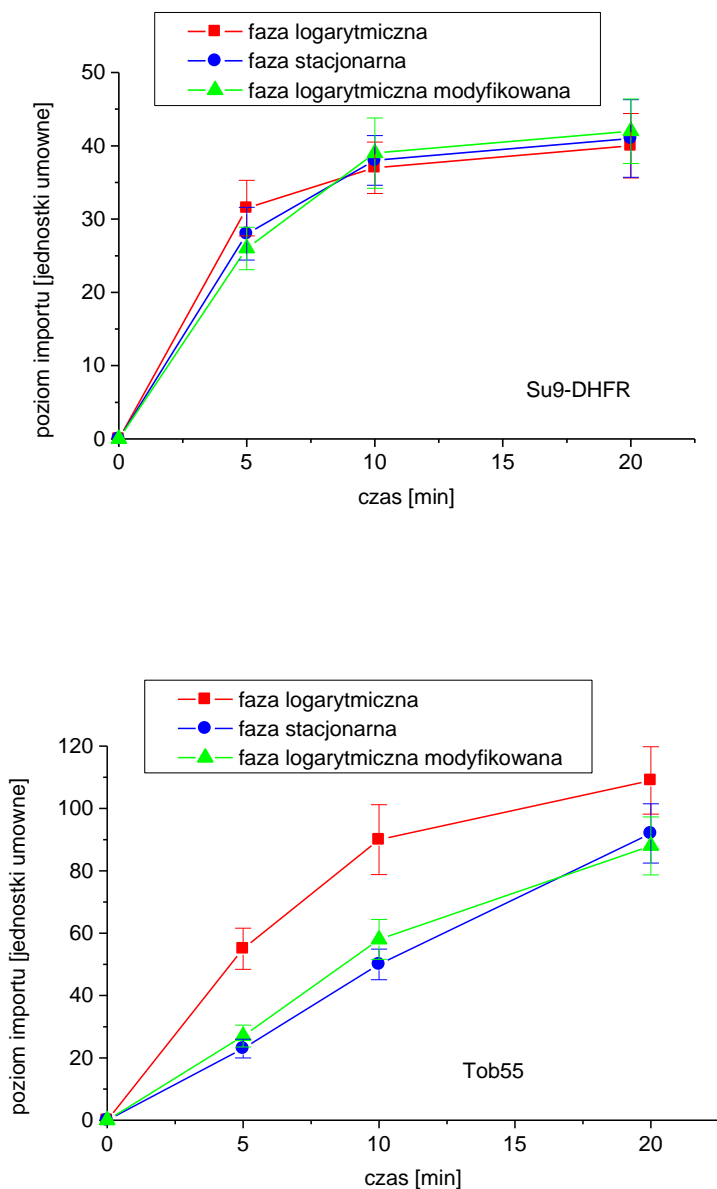
dzikiego, izolowanych z komórek w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu.

Na rys. 7.18 przedstawiono przykłady wyników reakcji importu obu białek, które wykorzystywano w analizach ilościowych. Białko Tob55 po wbudowaniu w błonę zewnętrzną mitochondriów *S. cerevisiae* podlega działaniu proteinazy K (PK), skutkiem czego powstają dwa fragmenty o wielkości około 20 i 30 kDa, przy czym dla oszacowania poziomu i szybkości tego białka uwzględnia się fragment o większej intensywności, czyli fragment 30 kDa (Habib i in., 2006). Białko fuzyjne Su9-DHFR (patrz Metody, p. 6.14.3) ulega importowi do błony wewnętrznej mitochondriów, przy czym prekursor (p) ulega przekształceniu w dojrzałą postać białka (m; z ang. mature) na skutek usunięcia presekwencji, pochodzącej z podjednostki 9 syntazy ATP, w wyniku działania proteaz matriksowych. Dojrzała forma białka nie podlega działaniu podanej z zewnątrz PK, a zatem degraduje ona tylko tę frakcję białka, która nie uległa importowi do błony wewnętrznej. Zatem, w obliczeniach poziomu i szybkości importu tego białka uwzględnia się prążek, określony symbolem „m”. Dla ilościowego oszacowania poziomu importu Tob55 i Su9-DHFR wykorzystano rozdziały elektroforetyczne mitochondriów po zakończonych reakcjach importu i detekcję za pomocą autoradiografii (patrz Metody, p. 6.14.4.).



Rys. 7.18

Przykłady typowych wyników importu białka Tob55 i Su9-DHFR do mitochondriów szczepu dzikiego izolowanych z komórek w fazie logarytmicznej wzrostu. Import znakowanych S^{35} białek (patrz Metody, p. 6.14.2) prowadzono przez 5, 10 i 20 minut zgodnie z procedurą opisaną w Metodach (p. 6.14.3). Po inkubacji mitochondria zawieszano w buforze SM (250 mM sacharoza, 10 mM MOPS-KOH, pH 7,2), a uzyskaną zawiesinę dzielono na dwie równe części. Jedną z nich traktowano proteinazą K (250 μ g/ml, 10 min, 0°C) (+PK), podczas gdy drugą pozostawiano jako kontrolę działania PK (-PK). Importowane białka uwidaczniano metodą autoradiografii (patrz Metody, p. 6.14.4). Wyznaczone wartości poziomu importu badanych białek przy określonym czasie trwania reakcji importu różniły się w granicach nie większych niż 15% (trzy niezależne eksperymenty dla obu białek). P oraz m oznaczają odpowiednio prekursor i dojrzałą postać białka Su9-DHFR. Białko Tob55 po wbudowaniu w błonę zewnętrzną mitochondriów podlega działaniu proteinazy K (PK), skutkiem czego powstają dwa fragmenty o wielkości około 20 i 30 kDa.



Rys. 19. Import białka Su9-DHFR i Tob55 do mitochondriów szczepu dzikiego izolowanych z komórek w logarytmicznej, modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Reakcje importu (patrz Metody, p.6.14.3. lub podpis Rys.7.18) prowadzono czasie 5, 10 i 20 minut. Przedstawiono wartości uśrednione (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) dla trzech odrębnych eksperymentów.

Na rys. 7.19 przedstawiono poziom i szybkość importu badanych białek do mitochondriów szczepu dzikiego izolowanych z komórek w różnej fazie wzrostu, a więc z komórek o różnych wartościach wewnątrzkomórkowych stanów redoks (patrz Wyniki, p. 7.2 i 7.5). W przypadku białka Su9-DHFR nie zaobserwowano różnic w przebiegu importu dla różnych faz wzrostu komórek. Natomiast dla białka Tob55 obserwowano wyraźne podobieństwo przebiegu importu do mitochondriów izolowanych z komórek w modyfikowanej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu w porównaniu z

mitochondriami izolowanymi z komórek w logarytmicznej fazie wzrostu. Obserwowane różnice w imporcie tego białka współwystępują z różnicami w poziomie ekspresji tego białka w mitochondriach izolowanych z komórek w analizowanych fazach wzrostu (patrz Wyniki, p. 7.7), co wskazuje na istotną rolę wewnątrzkomórkowych stanów redoks w regulacji poziomu białek mitochondrialnych poprzez ich oddziaływanie na proces importu białka do mitochondriów. Jednak biorąc pod uwagę wyniki uzyskane dla białka Su9-DHFR należy zauważyć, że mechanizm ten nie dotyczy wszystkich białek importowanych do mitochondriów.

8 Dyskusja

Prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów jest możliwe dzięki skutecznej komunikacji między mitochondriami i jądrem komórkowym, która z kolei wymaga zmiany w ekspresji i funkcjonowaniu szeregu białek zlokalizowanych w różnych przedziałach komórkowych. Obecnie nie ulega już wątpliwości, że istotną rolę w inicjowaniu tych zmian odgrywają sygnały, generowane przez mitochondria. Dostępne dane literaturowe wskazują, iż mogą one polegać na zmianach wewnątrzkomórkowych stanów oksydacyjno-redukcyjnych (redoks), w tym w obrębie cytozolu, a zmiany te pośredniczyć mogą następnie w regulacji ekspresji białek, także na poziomie transkrypcji, jak i ich aktywności, stabilizacji, lokalizacji, dostępności i oddziaływań z innymi cząsteczkami (np. Butow i Avadhani, 2004; Storz, 2006; Pesaresi i in., 2007, Woodson i Chory, 2008). W niniejszej pracy stwierdzono, że w przypadku drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w zmianach stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów pośredniczy białko VDAC, zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (Budzińska i in., 2007; Gałgańska i in. 2008 i 2010).

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są bardzo dobrym modelem w badaniach zależności funkcjonalnych między białkiem VDAC, wewnątrzkomórkowymi stanami redoks (np. cytozol, mitochondria) i ekspresją/aktywnością białek komórkowych. Po pierwsze, w mitochondriach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* występują tylko dwie izoformy białka VDAC (VDAC1 i VDAC2), kodowane przez odrębne geny – *POR1* i *POR2*, ale tylko białko VDAC1 tworzy funkcjonalny kanał (Blachly-Dyson i in., 1997; Lee i in., 1998). Jest to kanał o typowej charakterystyce, a brak innych izoform tworzących kanał, niezwykle upraszcza badania dotyczące znaczenia funkcji kanałowej białka VDAC. Po drugie, mutacje w obrębie obu izoform białka VDAC *S. cerevisiae* (mutanty $\Delta por1$ i $\Delta por2$) skutkują zmianami w transporcie metabolitów przez błonę zewnętrzną mitochondriów (Michejda i in., 1990; Lee i in., 1998; Kmita i in., 1999), jak i zmianami w ekspresji białek mitochondrialnych na poziomie białka i kodujących je mRNA (Antos i in., 2001; Kmita i in., 2004). Po trzecie, wewnątrzkomórkowe stany redoks u wyjściowego szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ są różne i łatwo je kontrolować (Gałgańska i in., 2008; 2010). Co istotne, ze względu na ewolucyjną bliskość linii rozwojowych zwierząt i grzybów, drożdże *S. cerevisiae* stanowią dogodny materiał w wyjaśnianiu zagadnień związanych z funkcjonowaniem komórek człowieka oraz dla opracowywania nowych technik diagnostycznych i terapii, związanych z różnymi schorzeniami i starzeniem się (np. Spradling i in., 2006).

Zmiana wewnątrzkomórkowych stanów redoks podczas wzrostu komórek *S. cerevisiae* jest faktem dobrze znanym (np. Drakulic i in., 2005), przy czym mechanizmy regulacji tego zjawiska nie zostały dotąd precyzyjnie wyjaśnione. Wyniki opisane w niniejszej pracy wskazują na izoformy białka VDAC jako istotny czynnik, pośredniczący w determinacji wewnątrzkomórkowych stanów redoks w komórkach *S. cerevisiae*. Jak pokazano (patrz Wyniki, p. 7.2 i 7.5), komórki szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu różnią się wartością stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów. Co istotne, aktywność podstawowych enzymów antyoksydacyjnych w cytozolu (CuZnSOD i katalaza) oraz w mitochondriach (MnSOD, peroksydaza glutationowa i reduktaza glutationowa) odpowiada obserwowanym zmianom stanów redoks w tych przedziałach, uruchamianym przez brak danej izoformy białka VDAC (patrz Wyniki, p. 7.6) Ogólnie rzecz biorąc, zmiana stanu redoks w kierunku utlenienia powoduje wzrost aktywności tych enzymów, podczas gdy zmiana w kierunku redukcji – spadek. Co ciekawe, poziom ekspresji MnSOD i CuZnSOD także zmienia się przy braku danej izoformy białka VDAC (patrz Wyniki, p. 7.7). Ponieważ enzymy antyoksydacyjne chronią komórki przed niebezpiecznymi zmianami stanów redoks, równocześnie przyczyniając się do determinacji aktualnie istniejących stanów redoks, obserwowany wpływ izoform białka VDAC na aktywność i poziom ekspresji tych enzymów wskazuje na udział białka VDAC w powstawaniu stanów redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów. Co więcej, przynajmniej częściowo zjawisko to nie zależy od funkcji kanałowej białka VDAC.

Biorąc pod uwagę zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów komórek szczepu dzikiego i obu badanych mutantów (patrz Wyniki, p. 7.2 i 7.5), można stwierdzić, że w determinacji stanu redoks w obrębie cytozolu uczestniczy głównie izoforma VDAC1, przy czym izoforma VDAC2 wywiera efekt ilościowy. Natomiast w przypadku stanu redoks w mitochondriach istotny jest udział obu izoform. Ponieważ wewnątrzkomórkowe stany redoks szacowano poprzez pomiar stężenia zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG) formy glutationu (patrz Metody, p. 6.8) oraz wyznaczenie wartości wskaźnika $GSH/(GSH+GSSG)$, można by sugerować, że różnice w poziomach redukcji w mitochondriach mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ można wytłumaczyć poprzez wzrastający poziom importu GSH do mitochondriów $\Delta por2$ lub wzrastający wyciek GSH z mitochondriów $\Delta por1$. Jednakże dla innych mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ stwierdzono, że brak VDAC1 osłabia wyciek GSH, co prowadzi do jego akumulacji, podczas gdy brak VDAC2 nie wpływa na import i wyciek GSH (Cummings i in., 2000). Dlatego obserwowane różnice poziomu redukcji w mitochondriach mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ mitochondriów są rezultatem procesów redoks. Co ciekawe, kierunek zmiany stanu redoks podczas przejścia z fazy logarytmicznej do fazy stacjonarnej wzrostu jest ten

sam w obrębie cytozolu i mitochondriów (tj. w obu przedziałach obserwuje się redukcję lub utlenienie) tylko w przypadku obecności izoformy VDAC2. Zatem, można sądzić, że izoforma VDAC2 jest kluczowa dla koordynacji stanów redoks między mitochondriami i cytozolem. Pojawia się oczywiście pytanie dotyczące mechanizmu funkcjonowania izoformy VDAC2 w mitochondriach *S. cerevisiae*. Jak wspomniano wcześniej, białko to nie jest zdolne do tworzenia kanału po rekonstytucji w sztuczne błony lipidowe, jednak poddane nadekspresji w komórkach *S. cerevisiae* znosi skutki fenotypowe mutacji genu kodującego izoformę VDAC1 (Blachly-Dyson i in., 1997; Lee i in., 1998), przy czym mechanizm supresji do tej pory nie został wyjaśniony.

Powyższe obserwacje wskazują na dwa mechanizmy udziału białka VDAC w determinacji wewnątrzkomórkowych stanów redoks w komórkach *S. cerevisiae*: wykorzystujący aktywność kanałową i niezwiązany z tą aktywnością. Oba te mechanizmy są prawdopodobnie istotne dla komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami (Pesaresi i in., 2007). Należy jednak pamiętać, że w determinacji stanu redoks w obrębie cytozolu mogą pośredniczyć także organelle i procesy komórkowe. Na przykład, wiadomo, że retikulum endoplazmatyczne bierze udział w tworzeniu wewnątrzkomórkowej homeostazy redoks (Goerlach i in., 2006). Co istotne, białko VDAC zostało zidentyfikowane w obrębie retikulum endoplazmatycznego (Shoshan-Barmatz i Israelson, 2005) jednakże jego rola w kontroli stanu redoks nie była badana. Brak jest także danych pozwalających precyzyjnie wyjaśnić udział izoform białka VDAC w determinacji stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów. Można jednak założyć, że skoro VDAC transportuje metabolity, w tym anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$; Han i in., 2003), to pośrednio i bezpośrednio uczestniczy w określaniu stanu redoks. Co ciekawe, w niniejszej pracy stwierdzono, że różnice stanu redoks w obrębie cytozolu obserwowane dla badanych komórek szczepu dzikiego i mutantów współwystępują z różnicami w poziomie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów (patrz Wyniki, p. 7.3 i 7.8). Poziom tego uwalniania może być kontrolowany przez CuZnSOD zlokalizowaną w przestrzeni międzybłonowej, ponieważ aktywność tego enzymu pozostaje w związku funkcjonalnym z izoformami białka VDAC (Budzińska i in., 2007).

Pojawia się oczywiście pytanie: w jaki sposób mitochondria $\Delta por1$ pozbawione izoformy VDAC1 tworzącej kanał uwalniają $O_2^{\cdot-}$? W niniejszej pracy wykazano, że poziom ekspresji białka Tom40, kluczowej podjednostki kompleksu TOM (Dolezal i in., 2006; Perry i in., 2008) wykazuje korelację z poziomem uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ (patrz Wyniki, p. 7.8). W badaniach tych bardzo istotne okazało się manipulowanie poziomem ekspresji białka Tom40, co uzyskano dzięki wprowadzeniu modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu komórek, która odpowiada fazie stacjonarnej wzrostu pod względem

wewnątrzkomórkowych stanów redoks oraz poziomu ekspresji pewnych białek mitochondrialnych, w tym białka Tom40 (patrz Wyniki, p. 7.5 i 7.7). Stwierdzona korelacja między poziomem ekspresji białka Tom40 i poziomem uwalniania $O_2^{\cdot-}$ pozostaje w zgodzie z wcześniej opublikowanymi danymi wskazującymi na udział kompleksu TOM w transporcie metabolitów przez błonę zewnętrzną mitochondriów drożdży zarówno przy braku, jak i w obecności izoformy VDAC1 (Kmita i Budzińska, 2000; Antos i in., 2001). Zatem, postanowiono sprawdzić hipotezę sformułowaną przez Hana i in. (2003) wskazującą kompleks TOM jako potencjalne miejsce uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów. W tym celu opracowano warunki blokady kompleksu TOM przez importowane białko (pb_2 -DHFR) i sprawdzono czy blokada ta prowadzi do hamowania uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów (patrz Wyniki, p. 7.9). Stwierdzono, że poziom hamowania na skutek blokady kompleksu TOM zależy od poziomu uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów i wzrasta wraz ze wzrostem uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów. Co więcej, istotna jest także obecność funkcjonalnego kanału VDAC. Jego brak zasadniczo zwiększa hamowanie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów w wyniku blokady kompleksu TOM. Co ciekawe, porównywalny poziom hamowania obserwowany dla mitochondriów izolowanych z komórek w stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu wskazuje na to, iż obie te fazy wykazują istotne podobieństwo warunków wewnątrzkomórkowych. Z drugiej strony, hamowanie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów w wyniku blokady kompleksu TOM obserwowane dla mitochondriów szczepu dzikiego wskazuje na możliwość udziału tego kompleksu w uwalniania $O_2^{\cdot-}$ nawet w obecności funkcjonalnego kanału VDAC. Co istotne, skuteczne hamowanie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów wymaga integralności strukturalnej błony zewnętrznej oraz funkcjonalnej kompleksu TOM. Stwierdzono bowiem, że w przypadku mitoplastów lub usunięcia podjednostek pełniących funkcję receptora w kompleksie TOM, hamowanie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ w wyniku blokady kompleksu TOM jest wyraźnie słabsze. Zatem, wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że w komórkach *S. cerevisiae* kompleks TOM może służyć jako dodatkowa droga uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów i jego transportu przez zewnętrzną błonę mitochondriów. Sytuacja taka ma miejsce nawet w obecności VDAC1, aczkolwiek rola kompleksu TOM wzrasta przy braku funkcjonalnego kanału VDAC.

Ponieważ wcześniej przeprowadzone badania wskazywały na zwiększenie poziomu ekspresji podjednostek kompleksu TOM, tj. Tom40 i Tom70 w mitochondriach mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ (Kmita i Budzińska, 2000; Antos i in., 2001), w niniejszej pracy postanowiono wyjaśnić mechanizm tego zjawiska. Ze względu na to, że komórki szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta por1$ i $\Delta por2$ wykazują różnice wewnątrzkomórkowych stanów redoks (patrz Wyniki, p. 7.2) postanowiono sprawdzić,

czy modyfikacja wewnątrzkomórkowych stanów redoks (patrz Wyniki, p. 7.5) prowadzić będzie do przewidywalnych zmian w poziomie ekspresji analizowanych białek. Jak wspomniano wcześniej, dostępne dane literaturowe wskazują, że zmiany wewnątrzkomórkowych stanów redoks, w tym w obrębie cytozolu, pośredniczyć mogą w regulacji ekspresji białek, także na poziomie transkrypcji, jak i ich aktywności, stabilizacji, lokalizacji, dostępności i oddziaływań z innymi cząsteczkami (np. Butow i Avadhani, 2004; Storz, 2006; Pesaresi i in., 2007, Woodson i Chory, 2008). W badaniach, obok białek Tom uwzględniono białko Tob55, kluczową podjednostkę kompleksu TOB/SAM (Dolezal i in., 2006; Perry i in., 2008) oraz dysmutazy ponadtlenkowe, tj. CuZnSOD (cytozol) i MnSOD (mitochondria), których aktywność wykazywała ścisłą korelację z istniejącymi wewnątrzkomórkowymi stanami redoks (patrz Wyniki, p. 7.6).

Wstępne eksperymenty, polegające na porównaniu poziomu ekspresji białek Tom40 i Tob55 w mitochondriach szczepu dzikiego i obu mutantów izolowanych z komórek w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu i różniących się stanami redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów (patrz Wyniki, p. 7.2 i 7.4), wskazały, że zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu w kierunku zwiększonego utlenienia współwystępują ze zwiększonym poziomem ekspresji białek Tom40 i Tob55. Aby zweryfikować powyższe ustalenie do badań włączono mitochondria izolowane z komórek w modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu. Wprowadzona modyfikacja polegała na kontrolowanej zmianie stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów w kierunku wartości charakterystycznych dla stacjonarnej fazy wzrostu, poprzez podanie do hodowli komórek we wczesnej logarytmicznej fazie wzrostu utleniacza lub reduktora, zależnie od badanego szczepu (patrz Wyniki, p. 7.5). Tym sposobem, dla danego szczepu, uzyskiwano komórki w fazie logarytmicznej wzrostu, ale o stanach redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów charakterystycznych dla fazy stacjonarnej wzrostu. Przeprowadzona analiza zmian poziomu ekspresji białek Tom40, Tom70 i Tob55, polegająca na wyznaczeniu wartości wskaźników różnicy poziomu ekspresji tych białek między mitochondriami danego mutantu i szczepu dzikiego oraz między fazami wzrostu (patrz Wyniki, p. 7.7), wskazuje na podobne zmiany ekspresji białek w fazie stacjonarnej i modyfikowanej fazie logarytmicznej wzrostu. Co więcej, obserwowane zmiany w ekspresji białek współwystępują ze zmianami stanu redoks w obrębie cytozolu, chociaż uzyskane dane nie pozwalają jednoznacznie wykluczyć wpływu stanu redoks w obrębie mitochondriów. Równocześnie, zmniejszająca się wartość stanu redoks w obrębie cytozolu (utlenienie) współwystępuje ze zwiększeniem ekspresji analizowanych białek. Zatem, modyfikacja stanu redoks w obrębie cytozolu prowadzi do przewidywalnych zmian w poziomie ekspresji badanych białek. Jak stwierdzono w

przypadku białka Tob55 (patrz Wyniki, p. 7.12) wewnątrzkomórkowe stany redoks odgrywają również istotną rolę w regulacji poziomu białek mitochondrialnych poprzez ich oddziaływanie na proces importu białka do mitochondriów. Należy jednak zauważyć, że mechanizm ten nie dotyczy wszystkich białek importowanych do mitochondriów, co stwierdzono analizując import białka fuzyjnego Su9-DHFR.

Analiza wyników opisanych w p. 7.6 i 7.7 rozdziału Wyniki prowadzi do ciekawych wniosków dotyczących ekspresji i aktywności dysmutaz ponadtlenkowych w mitochondriach i cytozolu. Poziom ekspresji MnSOD wydaje się być regulowany w sposób podobny do obserwowanego dla białek Tom i Tob55. Zatem, mechanizm regulacji ekspresji białek wykorzystujący zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu nie jest ograniczony do podjednostek kompleksów importowych błony zewnętrznej mitochondriów. Z drugiej strony, poziom ekspresji CuZnSOD w cytozolu w przypadku obu mutantów ulega zwiększeniu tylko w fazie logarytmicznej wzrostu. Jednakże porównanie poziomu ekspresji tego białka w przypadku frakcji cytozolowych izolowanych z komórek w fazie stacjonarnej i logarytmicznej wzrostu oraz modyfikowanej fazie logarytmicznej i logarytmicznej fazie wzrostu wskazuje na zakres zmian obserwowanych dla badanych szczepów w przypadku białek Tom i Tob55. Zatem zmiana jest największa w przypadku szczepu dzikiego i najmniejsza w przypadku mutantu $\Delta por1$. Należy jednak zauważyć, że w przypadku mutantu $\Delta por1$ aktywność CuZnSOD w cytozolu obniża się w fazie stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej fazie wzrostu, mimo że zmiany poziomu ekspresji CuZnSOD w cytozolu, wyrażone ilościowo w postaci wskaźników zmian poziomu ekspresji między mutantami i szczepem dzikim, wykazują korelację z różnicami w aktywności tego enzymu obliczonymi dla badanych frakcji cytozolowych. Stąd, można założyć, że zwiększenie stanu redukcji w obrębie cytozolu komórek $\Delta por1$ w fazie stacjonarnej i modyfikowanej logarytmicznej wzrostu wpływa na – zachodzącą po translacji – regulację aktywności CuZnSOD w cytozolu (Costa i in., 1997) i/lub stymuluje funkcje CuZnSOD inne niż eliminacja $O_2^{\cdot -}$ (Lee i in., 2001; Wawryn i in., 2002; Luschak i in., 2005). Z kolei w przypadku MnSOD brak zbieżności między poziomem ekspresji i aktywności jest nawet szerszy, szczególnie w przypadku mutantu $\Delta por2$. Wskaźniki zmiany poziomu ekspresji między mitochondriami szczepu dzikiego i mutantów nie wykazują korelacji z różnicami aktywności tego enzymu między tymi mitochondriami. Co więcej, zmiany aktywności MnSOD nie odpowiadają zmianom w poziomie ekspresji białka, z wyjątkiem mitochondriów szczepu dzikiego. Ponieważ podczas przejścia komórek z fazy logarytmicznej do stacjonarnej lub modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu poziom redukcji wzrasta w mitochondriach obu mutantów i to silniej w przypadku $\Delta por2$ (patrz Wyniki, p. 7.2 i 7.5), można założyć, że podobnie jak w przypadku CuZnSOD w

cytozolu, obserwowane rozbieżności wynikają ze zmian mechanizmów regulacji aktywności MnSOD (Costa i in., 1997; Lee i in., 2001; Wawryn i in., 2002; Luschak i in., 2005). Zatem, stan redoks w obrębie cytozolu jest istotnym czynnikiem regulującym poziom ekspresji CuZnSOD w cytozolu i MnSOD w mitochondriach, ale ich aktywność zależy od warunków redoks panujących w środowisku ich działania, tj. odpowiednio w cytozolu i mitochondriach. Ponieważ MnSOD i CuZnSOD pełnią różne role w ochronie komórek (Pereira i in., 2001; Zyracka i in., 2005), jest więc uzasadnione, że mechanizmy odpowiedzialne za regulację poziomu ekspresji tych enzymów i ich aktywności różnią się w szczegółach.

W przypadku białek Tom40, Tom70 i Tob55 badania, dotyczące wpływu inhibitorów transkrypcji (α -amanityny) i translacji (cykloheksymid) w warunkach kontrolowanej zmiany wewnątrzkomórkowych stanów redoks (patrz Wyniki, p. 7.10), wskazują na istotną rolę zmian w poziomie mRNA kodujących te białka w mechanizmie regulacji ich ekspresji w mitochondriach. Pozostaje to w zgodzie z opublikowanymi danymi wskazującymi, że brak izoformy VDAC1 w mitochondriach *S. cerevisiae* prowadzi do wzrostu poziomu mRNA kodujących białka Tom40 i Tom70 (Kmita i in., 2004). Zatem, obecność lub brak funkcjonalnego kanału VDAC wydają się być istotnymi sygnałami, kontrolującymi ekspresję genów *TOM40* i *TOM70*. W związku z tym postanowiono sprawdzić wpływ kontrolowanych zmian wewnątrzkomórkowych stanów redoks w komórkach *S. cerevisiae* na poziom ekspresji mRNA, kodujących wybrane białka komórkowe, wykorzystując metodę ilościowej RT-PCR (patrz Wyniki, p. 7.11). Porównanie wartości względnych poziomów mRNA między szczepem dzikiem i mutantami, z uwzględnieniem zmian wewnątrzkomórkowych stanów redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów komórek w analizowanych fazach wzrostu, pozwoliło stwierdzić, że stan redoks w obrębie cytozolu wpływa istotnie na poziom transkryptów *AQY1*, *MDM10*, *MKS1*, *POR1*, *RTG2*, *TOB38*, *TOB55*, *SOD1*, *SOD2*, *TIM22*, *TOM40*. Równocześnie stwierdzono wpływ mitochondrialnego stanu redoks w przypadku transkryptów *AQY1*, *MDM10*, *MKS1*, *POR1*, *RTG2*, *TOB55*, *SOD1*, *SOD2*, *TIM22*, *TIM23*, *TOM40*. Zatem, zależne od wewnątrzkomórkowych stanów redoks zmiany poziomów transkryptów *TOM40*, *TOB55*, *SOD1* i *SOD2* są elementem mechanizmu regulacji ekspresji tych genów i przyczyniają się do zmian w ich ekspresji na poziomie białka (patrz Wyniki, p. 7.7).

Jak stwierdzono powyżej wewnątrzkomórkowy stan redoks odgrywa istotną rolę w regulacji poziomu mRNA kodującego białko Rtg2 uczestniczące w komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami. Dostępne dane wskazują również, że, w przypadku komórek *S. cerevisiae* modyfikacja wewnątrzkomórkowych stanów redoks prowadzi do zmian poziomu mRNA, kodujących jądrowe czynniki transkrypcyjne,

uczestniczące w adaptacji do zmian stanów redoks (Mns2 i Mns4), oraz białko Rtg2 (Aragon i in., 2008). Postanowiono zatem zbadać wpływ izoformy VDAC1 na poziom transkryptów białek jądrowych uczestniczących w adaptacji do zmian wewnątrzkomórkowych stanów redoks, w tym czynników transkrypcyjnych, oraz białek uczestniczących w komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami. Jak wyjaśniono w p. 7.11 rozdziału Wyniki, reakcje ilościowej RT-PCR przeprowadzono dla komórek szczepu dzikiego i mutantu $\Delta por1$ w różnych fazach wzrostu, uwzględniając następujące geny: *RTG1* i *RTG2*, kodujące białka uczestniczące w komunikacji jądro komórkowe – mitochondria, geny *MSN2*, *MSN4*, *YAP2*, *SKN7* i *YAP1*, kodujące jądrowe czynniki transkrypcyjne uczestniczące w adaptacji do zmian stanów redoks oraz gen *SIR2*, kodujący jądrowy czujnik stanu redoks (Butow i in., 2004; Liu i in., 2005; Cabisco i in., 2000; Drakulic i in., 2005). Jako kontrolne geny zastosowano: *HAP4*, kodujący jądrowy czynnik transkrypcyjny kontrolujący geny metabolizmu tlenowego, *GPX*, kodujący cytoplazmatyczny czujnik stanu redoks, *PUF3*, kodujący białko kontrolujące transport i stabilność mRNA kodujących białka importowane do mitochondriów oraz *TOM40*, kodujący białko Tom40 (Liu i in., 2005; García-Rodríguez i in., 2007; Dolezal i in., 2007; Bohnert i in., 2007; Mokranjac i in., 2009). Niezależnie od typu badanych komórek, względne poziomy mRNA, wyznaczone dla modyfikowanej logarytmicznej fazy wzrostu, są bardziej zbliżone do uzyskanych dla stacjonarnej fazy wzrostu niż logarytmicznej fazy wzrostu, co wskazuje na ważną rolę wewnątrzkomórkowych stanów redoks w mechanizmie obserwowanych zmian. Z drugiej strony, brak izoformy VDAC1, tworzącej funkcjonalny kanał w mitochondriach *S. cerevisiae*, prowadzi do wyraźnego obniżenia względnych poziomów mRNA, kodujących białka uczestniczące w komunikacji jądro komórkowe/mitochondria (Rtg1, Rtg2) oraz białka jądrowe pełniące funkcję czujnika stanów redoks (Sir2) i uczestniczące w przystosowaniu do zmian stanów redoks (Skn7, Msn2, Msn4, Yap1, Yap2).

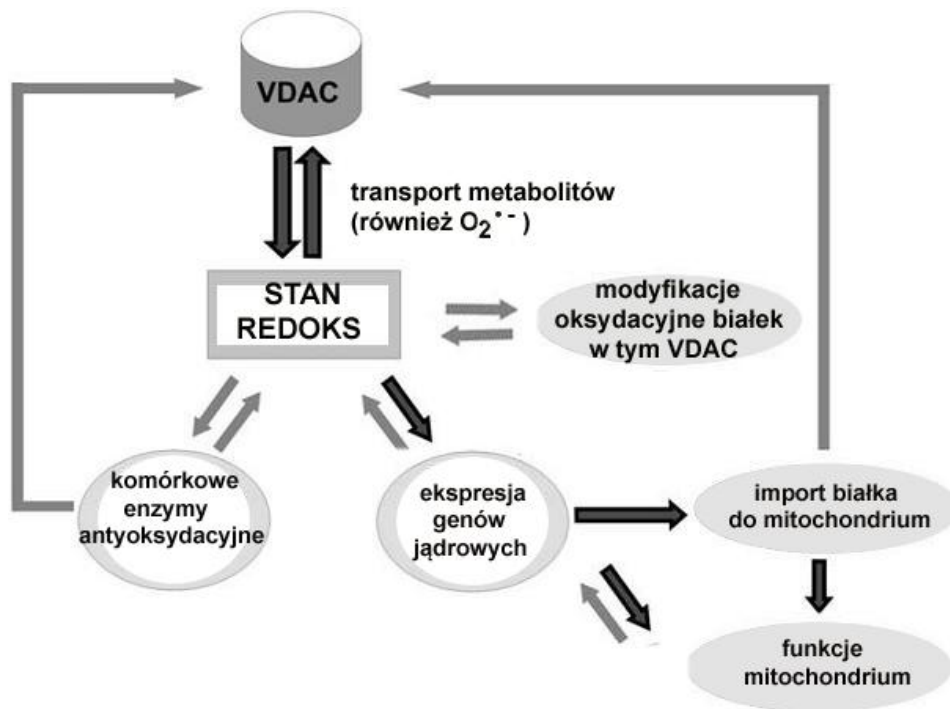
Równocześnie wyznaczone wartości współczynnika zmiany względnego poziomu mRNA wskazują na wyraźne zmiany względnego poziomu mRNA dla obu badanych szczepów, z wyjątkiem mRNA, kodującego białka Rtg1 i Hap4. W przypadku białek Sir2, Skn7, Msn2, Msn4, Yap1, Yap2, Gpx, Puf3 i Tom40 dochodzi do spadku względnego poziomu kodujących te białka mRNA w komórkach mutantu $\Delta por1$ i wzrostu w komórkach szczepu dzikiego. Natomiast dla białek Rtg1 i Hap4, niezależnie od typu badanych komórek, względny poziom mRNA w przypadku Rtg1 spada, a wzrasta w przypadku Hap4. Co istotne, obniżenie względnych poziomów mRNA, obserwowane dla komórek $\Delta por1$, wykazuje korelację ze wskaźnikiem zmiany stanu redoks oszacowanym dla cytozolu, ale nie dla mitochondriów. Dla komórek szczepu

dzikiego wzrost względnego poziomu mRNA także współwystępuje ze wskaźnikiem zmiany stanu redoks oszacowanym dla cytozolu, przy czym otrzymane wartości wskaźnika zmiany stanu redoks w obrębie mitochondriów nie pozwalają wykluczyć wpływu tego parametru na obserwowane zmiany względnego poziomu mRNA. W przypadku mRNA, kodujących białka Rtg1 i Hap4, zmiany stanu redoks w obrębie cytozolu i mitochondriów nie mają wpływu na obserwowane zmiany poziomu mRNA. Można zatem założyć, że w przypadku tych mRNA obecność białka VDAC1 wpływa na ich względny poziom w sposób niezależny od zmian wewnątrzkomórkowego stanu redoks. Z kolei w przypadku mRNA, kodujących Rtg2, Sir2, Skn7, Msn2, Msn4, Yap1, Yap2, Gpx, Puf3 i Tom40 zmiana stanu redoks w kierunku utlenienia, głównie w obrębie cytozolu, prowadzi do wzrostu względnego poziomu mRNA.

Pojawia się zatem pytanie, w jaki sposób izoforma VDAC1 może wpływać na poziom transkryptów genów RTG1 i HAP4, jeśli w obserwowanych zmianach nie pośredniczą zmiany wewnątrzkomórkowych stanów redoks. Wiadomo, że w odpowiedzi na stres oksydacyjny komórki uruchamiają ekspresję wielu genów, w tym genów kodujących czynniki transkrypcyjne. Ich ekspresja, struktura, lokalizacja i powinowactwo względem DNA są bezpośrednio lub pośrednio regulowane przez poziom utlenienia (Liu i in., 2005; Lushchak, 2010). Jak wspomniano wcześniej, z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że udział kanału VDAC w determinacji wewnątrzkomórkowych stanów redoks polega na transporcie metabolitów, uczestniczących bezpośrednio lub pośrednio w powstaniu stanu redoks, np. $O_2^{\cdot-}$. Co istotne, kanał VDAC jest bardzo wrażliwy na modyfikacje oksydacyjne (O'Brien i in., 2004; Mello i in., 2007), które w znaczący sposób mogą zmienić jego funkcjonowanie w odpowiedzi na zachodzące zmiany stanu redoks (Karachitos i in., 2009). Z drugiej strony, kanał VDAC ma kluczowe znaczenie dla aktywności łańcucha oddechowego w mitochondriach, ponieważ ma fundamentalne znaczenie dla transportu metabolitów przez błonę zewnętrzną mitochondriów (Lee i in., 1998; Kmita i in., 1999). Z kolei wiadomo, że aktywność łańcucha oddechowego ma istotne znaczenie dla aktywności białek Hap, w tym białka Hap4 (Butow i Avadhani, 2004). Zatem, obecność lub brak funkcjonalnego kanału VDAC to ważny element regulacji poziomu mRNA kodującego białko Hap4. W przypadku mRNA kodującego białko Rtg1 istotnym czynnikiem kontrolującym jest zapewne wewnątrzkomórkowy poziom metabolitów, w tworzeniu którego niewątpliwie uczestniczy kanał VDAC (np. Crespo i in., 2002), przy czym częściowo obserwowany efekt może wynikać ze zmian w ekspresji białka Rtg2, które kontroluje aktywność białka Rtg1 (Butow i Avadhani, 2004).

Podsumowując, zmiany wewnątrzkomórkowych stanów redoks w komórkach *S. cerevisiae*, w tym w obrębie cytozolu, odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji

szeregu białek komórkowych, w tym białek kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów oraz komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami. W zmianach wewnątrzkomórkowych stanów redoks pośredniczy białko VDAC, przy czym przynajmniej częściowo zjawisko to nie zależy od funkcji kanałowej białka VDAC. Zwiększona ekspresja pewnych białek mitochondrialnych uruchamiana w przypadku braku funkcjonalnego kanału VDAC lub w starszych komórkach w obecności tego kanału może mieć kluczowe znaczenie dla przetrwania komórek. Na przykład, zwiększona ekspresja białek Tom może zwiększać szansę włączenia tego kompleksu w proces transportu metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy pozwalają na zaproponowanie wyjaśnienia roli białka VDAC w mechanizmie regulacji ekspresji i aktywności białek, opartym na zmianach wewnątrzkomórkowych stanów redoks, w tym w obrębie cytozolu (patrz schemat poniżej). Zatem, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki można stwierdzić, że białko VDAC jest istotnym elementem sieci białek, kontrolujących funkcjonowanie mitochondriów poprzez determinację wewnątrzkomórkowych stanów redoks i/lub pełniących funkcję czujnika stanu redoks. Pozostaje to w zgodzie z rosnącą liczbą danych wskazujących na VDAC jako „zarządcę” funkcjonowania mitochondriów (Mannella i Kinally, 2008; Rostovtseva i Bezrukov, 2008; Shoshan-Barmatz i in., 2010).



Rys.1.
 Udział VDAC w regulacji aktywności i ekspresji białek mitochondrialnych (według Gałgańska i in., 2010)

9 Streszczenie

1. Izoformy białka VDAC to istotny czynnik pośredniczący w determinacji wewnątrzkomórkowych stanów redoks w komórkach *S. cerevisiae*. W determinacji stanu redoks w obrębie cytozolu uczestniczy głównie izoforma VDAC1, przy czym izoforma VDAC2 wywiera efekt ilościowy. Natomiast w przypadku stanu redoks w mitochondriach istotny jest udział obu izoform. Co ciekawe, izoforma VDAC2 jest kluczowa dla koordynacji stanów redoks między mitochondriami i cytozolem.
2. Aktywność podstawowych enzymów antyoksydacyjnych w cytozolu (CuZnSOD i katalaza) oraz w mitochondriach (MnSOD, peroksydaza glutationowa i reduktaza glutationowa) odpowiada zmianom stanów redoks w tych przedziałach, obserwowanym w nieobecności danej izoformy białka VDAC.
3. Różnice stanu redoks w obrębie cytozolu, obserwowane dla badanych komórek szczepu dzikiego i mutantów, współwystępują z różnicami w poziomie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów, przy czym w uwalnianiu $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów uczestniczy także kompleks TOM, co jest szczególnie widoczne w przypadku mutantu pozbawionego kanału VDAC (izoforma VDAC1).
4. Stan redoks w obrębie cytozolu odgrywa istotną rolę w determinacji poziomu ekspresji białek tworzących kanały w kompleksach importowych zewnętrznej błony mitochondrialnej. Co więcej, poziom ekspresji białka Tom40 wykazuje korelację z poziomem uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów.
5. Wewnątrzkomórkowy stan redoks uczestniczy w regulacji procesu importu niektórych białek (Tob55/Sam50) do mitochondriów.
6. Modyfikacja wewnątrzkomórkowych stanów redoks prowadzi do przewidywalnych zmian w poziomie ekspresji białek tworzących kanały w kompleksach importowych zewnętrznej błony mitochondrialnej, przebiegu importu Tob55/Sam50 do mitochondriów, aktywności podstawowych enzymów antyoksydacyjnych i poziomie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ z mitochondriów.
7. Wewnątrzkomórkowy stan redoks jest istotnym czynnikiem regulującym poziom mRNA kodujących białka uczestniczące w imporcie białka do mitochondriów (Mdm10, Tob38, Tob55, Tim22, Tim23 i Tom40), enzymy antyoksydacyjne (MnSOD i CuZnSOD) oraz białka uczestniczące w komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami (Mks1 i Rtg2) i jądrowe czynniki transkrypcyjne uczestniczące w adaptacji do zmian stanów redoks (Msn2, Msn4, Yap1, Yap2, Skn7), jak i białko Sir2, pełniące funkcję czujnika stanu redoks w jądrze

komórkowym. Należy jednak zauważyć, że VDAC1 wpływa na poziom transkryptów genów kodujących białka także w sposób niezależny od stanu redoks (Hap4, Rtg1).

8. Podsumowując, zmiany wewnątrzkomórkowych stanów redoks w komórkach *S. cerevisiae*, w tym w obrębie cytozolu, odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji szeregu białek komórkowych, w tym białek kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów oraz komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami. W determinacji wewnątrzkomórkowych stanów redoks pośredniczą izoformy białka VDAC, przy czym przynajmniej częściowo zjawisko to nie zależy od funkcji kanałowej białka VDAC.

10 Bibliografia

- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., Nussberger, S.** (2001) Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol.* 153(6):1151-1160.
- Akerboom, T.P., Sies, H.** (1981) *Methods Enzymol.* 77:373–382.
- Alexander, H.K., Booy, E.P., Xiao, W., Ezzati, P., Baust, H., Los, M.** (2007) Selected technologies to control genes and their products for experimental and clinical purposes. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 55 (3):139–149.
- Allen, J. F.** (2003) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1429):19-37.
- Antos, N., Stobienia, O., Budzińska, M., Kmita, H.** (2001) Under conditions of insufficient permeability of VDAC1, external NADH may use the TOM complex channel to cross the outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 33(2):119-126.
- Aragon, A.D., Quiñones, G.A., Thomas, E.V., Roy, S. Werner-Washburne, M.** (2006) Release of extraction-resistant mRNA in stationary phase *Saccharomyces cerevisiae* produces a massive increase in transcript abundance in response to stress. *Genome Biol.* 7:R9.
- Aragon, A. D., Rodriguez, A. L., Meirelles, O., Roy, S., Davidson, G. S., Tapia, P. H., Allen, C., Joe, R., Benn, D., Werner-Washburne, M.** (2008) Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures. *Mol Biol Cell.* 19(3):1271-1280.
- Bartosz, G.** (2003) Druga twarz tlenu, PWN, Warszawa
- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Zeth, K.** (2008) Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40):15370-15375.
- Becker, T., Gebert, M., Pfanner, N., van der Laan, M.** (2009) Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 21(4):484-493.
- Beckman, J. S.** (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 9(5):836-844.
- Benz, R.** (1994) Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membrane: review on mitochondrial porins. *Biochim. Biophys. Acta* 1197:167-196.
- Blachly-Dyson, E., Forte, M.** (2001) VDAC channels. *IUBMB Life* 52:113-118.
- Blachly-Dyson, E., Song, J., Wolfgang, W. J., Colombini, M., Forte, M.** (1997) Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol Cell Biol.* 17(10):5727-5738.
- Bohnert, M., Pfanner, N., van der Laan, M.** (2007) A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. *FEBS Lett.* 581(15):2802-2810.
- Budzińska, M., Gałgańska, H., Karachitos, A., Wojtkowska, M., Kmita, H.** (2009) The TOM complex is involved in the release of superoxide anion from mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 41(4):361-367.
- Budzinska, M., Galganska, H., Wojtkowska, M., Stobienia, O., Kmita, H.** (2007) Effects of VDAC isoforms on CuZn-superoxide dismutase activity in the intermembrane space of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 357(4):1065-1070.

- Butow, R. A., Avadhani, N. G.** (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14(1):1-15.
- Butterfield, D. A., Gnjec, A., Poon, H. F., Castegna, A., Pierce, W. M., Klein, J. B., Martins, R. N.** (2006) Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in inherited Alzheimer's disease: an initial assessment. *J Alzheimers Dis.* 10(4):391-397.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., Ros, J.** (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275(35):27393-27398.
- Cannino, G., Di Liegro, C. M., Rinaldi, A. M.** (2007) Nuclear-mitochondrial interaction. *Mitochondrion.* 7(6):359-366.
- Cavalier-Smith, T.** (2009) Megaphylogeny, cell body plans, adaptive zones: causes and timing of eukaryote basal radiations. *J Eukaryot Microbiol.* 56(1):26-33.
- Choksi, K. B., Papaconstantinou, J.** (2008) Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse heart mitochondrial electron transport chain complexes. *Free Radic Biol Med.* 44(10):1795-1805.
- Colombini, M. (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem.* 256-257(1-2):107-115.
- Costa, V., Amorim, M. A., Reis, E., Quintanilha, A., Moradas-Ferreira, P.** (1997) Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* 143(Pt 5):1649-1656.
- Crespo, J. L., Powers, T., Fowler, B., Hall, M. N.** (2002) The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10):6784-6789.
- Culotta, V. C., Yang, M., O'Halloran, T. V.** (2006) Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 1763(7):747-758.
- Cummings, B. S., Angeles, R., McCauley, R. B., Lash, L. H.** (2000) Role of voltage-dependent anion channels in glutathione transport into yeast mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 5;276(3):940-944.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., Lithgow, T.** (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313(5785):314-318.
- Drakulic, T., Temple, M. D., Guido, R., Jarolim, S., Breitenbach, M., Attfeld, P. V., Dawes, I. W.** (2005) Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 5(12):1215-1228.
- Duchen, M. R.** (2004) Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 53 Suppl 1:S96-102.
- Finkel, T.** (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 15(2):247-54.
- Gałecka, E., Jacewicz, R., Mrowicka, M., Florkowski, A., Gałecki, P.** (2008) Antioxidative enzymes – structure, properties, functions. *Pol Merkur Lekarski* 25(147):266-268.
- Galganska, H., Budzinska, M., Wojtkowska, M., Kmita, H.** (2008) Redox regulation of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: possible role of VDAC. *Arch Biochem Biophys.* 479(1):39-45.

- Galganska, H., Karachitos, A., Wojtkowska, M., Stobienia, O., Budzinska, M., Kmita, H.** (2010) Communication between mitochondria and nucleus: Putative role for VDAC in reduction/oxidation mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7):1276-1280.
- García-Rodríguez, L. J., Gay, A. C., Pon, L. A.** (2007) Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J Cell Biol.* 176(2):197-207.
- Gatsos, X., Perry, A. J., Anwari, K., Dolezal, P., Woly nec, P. P., Likić, VA., Purcell, A. W., Buchanan, S. K., Lithgow, T.** (2008) Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 32(6):995-1009.
- Goerlach, A., Klappa, P., Kietzmann, T.** (2006) The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal.* 8(9-10):1391-1418.
- Habib, S. J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W., Rapaport, D.** (2006) Assembly of the TOB complex of mitochondria. *J Biol Chem.* 280(8):6434-6440.
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., Cadenas, E.** (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem.* 278(8):5557-5563.
- Herber, D.L., Cao, W., Nefedova, Y., Novitskiy, S. V., Nagaraj, S., Tyurin, V. A., Corzo, A., Cho, H., Celis, E., Lennox, B., Knight, S. C., Padhya, T., McCaffrey, T. V., McCaffrey J. C., Antonia, S., Fishman, M., Ferris, R. L., Kagan, V.E., Gabrilovich, D.I.** (2010) Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat Med.* 16(8): 858-859.
- Herrmann, J. M.** (2003) Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol.* 11(2):74-79.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M. T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., Pfanner, N.** (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 395(6701):516-521.
- Hiller, S., Garces, R. G., Malia, T. J., Orekhov, V. Y., Colombini, M., Wagner, G.** (2008) Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science* 321(5893):1206-1210.
- Hoppins, S. C., Nargang, F. E.** (2004) The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J Biol Chem.* 279(13):12396-12405.
- Hönlinger, A., Bömer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., Pfanner, N.** (1996) Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J.* 15:2125-2137.
- Jezek, P., Hlavatá, L.** (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(12):2478-2503.
- Jo, S. H., Son, M. K., Koh, H. J., Lee, S. M., Song, I. H., Kim, Y. O., Lee, Y. S., Jeong, K. S., Kim, W. B., Park, J. W., Song, B. J., Huh, T.L.** (2001) Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 276(19):16168-16176.
- Karachitos, A., Galganska, H., Wojtkowska, M., Budzinska, M., Stobienia, O., Bartosz, G., Kmita, H.** (2009) Cu,Zn-superoxide dismutase is necessary for proper function of VDAC in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEBS Lett.* 583(2):449-455.

- Kmita, H., Antos, N., Wojtkowska, M., Hryniewiecka, L.** (2004) Processes underlying the upregulation of Tom proteins in *S. cerevisiae* mitochondria depleted of the VDAC channel. *J Bioenerg Biomembr.* 36(2):187-193.
- Kmita, H., Budzińska, M.** (2000) Involvement of the TOM complex in external NADH transport into yeast mitochondria depleted of mitochondrial porin1. *Biochim Biophys Acta* 1509(1-2):86-94.
- Kmita, H., Stobienia, O., Michejda, J.** (1999) The access of metabolites into yeast mitochondria in the presence and absence of the voltage dependent anion selective channel (YVDAC1). *Acta Biochim Pol.* 46(4):991-1000.
- Kozjak-Pavlovic, V., Ross, K., Benlasfer, N., Kimmig, S., Karlas, A., Rudel, T.** (2007) Conserved roles of Sam50 and metaxins in VDAC biogenesis. *EMBO Rep.* 8(6):576-582.
- Kuenkele, K. P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F. E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., Neupert, W.** (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93(6):1009-1019.
- Kuenkele, K. P., Juin, P., Pompa, C., Nargang, F. E., Henry, J.P., Neupert, W., Lill, R., Thieffry, M.** (1998) The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J Biol Chem.* 273(47):31032-31039.
- Kutik, S., Stroud, D. A., Wiedemann, N., Pfanner, N.** (2009) Evolution of mitochondrial protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1790(6):409-415.
- Lai, J. C., Tan, W., Benimetskaya, L., Miller, P., Colombini, M., Stein, C. A.** (2006) A pharmacologic target of G3139 in melanoma cells may be the mitochondrial VDAC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(19):7494-7499.
- Lebiedzinska, M., Duszynski, J., Rizzuto, R., Pinton, P., Wieckowski, M. R.** (2009) Age-related changes in levels of p66Shc and serine 36-phosphorylated p66Shc in organs and mouse tissues. *Arch Biochem Biophys.* 486(1):73-80.
- Lee, A. C., Xu, X., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Colombini, M.** (1998) The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane. *J Membr Biol.* 161(2):173-181.
- Liu, H., Colavitti, R., Rovira, I. I., Finkel, T.** (2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res.* 97(10):967-974.
- Łukaszewicz-Hussain, A.** (2003) Uszkodzenie komórki - rola mitochondriów. *Postępy Biochemii* 49:250-256.
- Lushchak, V., Semchyshyn, H., Mandryk, S., Lushchak, O.** (2005) Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. *Arch Biochem Biophys.* 441(1):35-40.
- Madesh, M., Hajnóczy, G.** (2001) VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol.* 155(6):1003-1015.
- Mammucari, C., Rizzuto, R.** (2010) Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Ageing Dev.* 131(7-8):536-543.
- Mannella, C. A., Kinnally, K. W. (2008) Reflections on VDAC as a voltage-gated channel and a mitochondrial regulator. *J Bioenerg Biomembr.* 40(3):149-155.
- McEnery, M. W., Snowman, A. M., Trifiletti, R. R., Snyder, S. H.** (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent

anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8):3170-3174.

Meisinger, C., Wiedemann, N., Rissler, M., Strub, A., Milenkovic, D., Schönfisch, B., Müller, H., Kozjak, V., Pfanner, N. (2006) Mitochondrial protein sorting: differentiation of beta-barrel assembly by Tom7-mediated segregation of Mdm10. *J Biol Chem.* 281(32):22819-22826.

Mello, C. F., Sultana, R., Piroddi, M., Cai, J., Pierce, W. M., Klein, J. B., Butterfield, D. A. (2007) Acrolein induces selective protein carbonylation in synaptosomes. *Neuroscience* 147(3):674-679.

Michejda, J., Kmita, H., Stobienia, O., Budzińska, M., Lauquin, G. J. M. (1994) Restriction of metabolite permeation through the outer mitochondrial membrane of porin-deficient yeast mutant. W: „Molecular Biology of Mitochondrial Transport Systems” *Springer-Verlag, Berlin, NATO Series H83*:341-356.

Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Pfanner, N., Meisinger, C. (2004) Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J Biol Chem.* 279(21):22781-22785.

Mithani, S. K., Shao, C., Tan, M., Smith, I. M., Califano, J. A., El-Naggar, A. K., Ha, P. K. (2009) Mitochondrial mutations in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *PLoS One* 4(12):e8493.

Mokranjac, D., Neupert, W. (2008) Energetics of protein translocation into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8):758-762.

Monsalve, M., Borniquel, S., Valle, I., Lamas, S. (2007) Mitochondrial dysfunction in human pathologies. *Front Biosci.* 12:1131-1153.

Neupert, W., Herrmann, J. M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 76:723-749.

O'Brien, K. M., Dirmeier, R., Engle, M., Poyton, R. O. (2004) Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem.* 279(50):51817-51827.

Olson, M., Kornbluth, S. (2001) Mitochondria in apoptosis and human disease. *Curr Mol Med.* 1(1):91-122.

Paschen, S. A., Neupert, W., Rapaport, D. (2005) Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 30(10):575-582.

Paschen, S. A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D., Neupert, W. (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 426(6968):862-866.

Pereira, M. D., Eleutherio, E. C., Panek, A. D. (2001) Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol.* 1:11.

Perry, A. J., Rimmer, K. A., Mertens, H. D., Waller, R. F., Mulhern, T. D., Lithgow, T., Gooley, P. R. (2008) Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant Physiol Biochem.* 46(3):265-274.

Pesaresi, P., Schneider, A., Kleine, T., Leister, D. (2007) Interorganellar communication. *Curr Opin Plant Biol.* 10(6):600-606.

Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C., Lithgow, T. (2004) Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol.* 11(11):1044-1048.

- Poleti, M. D., Tesch, A. C., Crepaldi, C. R., Souza, G. H., Eberlin, M. N., de Cerqueira César, M.** (2009) Relationship between expression of voltage-dependent anion channel (VDAC) isoforms and type of hexokinase binding sites on brain mitochondria. *J Mol Neurosci.* 41(1):48-54.
- Potter, S. Z., Valentine, J. S.** (2003) The perplexing role of copper-zinc superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis (Lou Gehrig's disease). *J Biol Inorg Chem.* 8(4):373-380.
- Rapaport, D.** (2005) How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane? *J Cell Biol.* 171(3):419-423.
- Rebrin, I., Sohal, R. S.** (2008) Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(13-14):1545-1552.
- Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C.** (2003) Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane--a guided tour. *J Mol Biol.* 21;326(3):639-57.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., Symons M.C.R., Burdon, R.H., Knippenberg, P.H.** (1991) Techniques in Free Radicals Research. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam* 201–203.
- Rostovtseva, T. K., Bezrukov, S. M. (2008) VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J Bioenerg Biomembr.* 40(3):163-170.
- Saccone, C., Caggese, C., D'Erchia, A. M., Lanave, C., Oliva, M., Pesole, G.** (2003) Molecular clock and gene function. *J Mol Evol.* 57 Suppl 1:S277-285.
- Saier, M. H. Jr.** (2006) Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol.* 214(2):75-90.
- Sampson, M.J., Lovell, R.S., Davison, D.B., Craigen, W.J.** (1996) A novel mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel gene localizes to chromosome 8. *Genomics* 36(1):192-196.
- Schein, S. J., Colombini, M., Finkelstein, A.** (1976) Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol.* 30(2):99-120.
- Schmidt, O., Pfanner, N., Meisinger, C.** (2010) Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(9):655-667.
- Ścibor, D., Czeczot, H.** (2006) Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. *Post. Hig. Med.Dośw.* 60:170-180.
- Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., Arbel, N.** (2010) VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med.* 31(3):227-85.
- Shoshan-Barmatz, V., Israelson, A.** (2005) The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function. *J Membr Biol.* 204(2):57-66.
- Shoshan-Barmatz, V., Israelson, A., Brdiczka, D., Sheu, S. S.** (2006) The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des.* 12(18):2249-70.
- Shoshan-Barmatz, V., Zakar, M., Rosenthal, K., Abu-Hamad, S.** (2009) Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochim Biophys Acta.* 1787(5):421-430.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N.,**

- Meisinger, C.** (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23):13207-13212.
- Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., Culotta, V. C.** (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276:38084–38089.
- Song, J., Midson, C., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Colombini, M.** (1998) The sensor regions of VDAC are translocated from within the membrane to the surface during the gating processes. *Biophys J.* 74(6):2926-2944.
- Spradling, A., Ganetsky, B., Hieter, P., Johnston, M., Olson, M., Orr-Weaver, T., Rossant, J., Sanchez, A., Waterston, R.** (2006) New roles for model genetic organisms in understanding and treating human disease: report from the 2006 Genetics Society of America meeting. *Genetics* 172(4):2025-2032.
- Stohs, S.J., Bagchi, D.** (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic. Biol. Med.* 18:321–336.
- Stojanovski, D., Guiard, B., Kozjak-Pavlovic, V., Pfanner, N., Meisinger, C.** (2007) Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins. *J Cell Biol.* 179(5):881-893.
- Storz, P.** (2006) Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. *Sci STKE.* 2006(332):re3.
- Suzuki, H., Maeda, M., Mihara, K.** (2002) Characterization of rat TOM70 as a receptor of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Sci.* 115(Pt 9):1895-1905.
- Teste, M. A., Duquenne, M., Francois, J. M., Parrou J. L.** (2009) Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Molecular Biology* 10:99
- Tatton, W. G., Olanow, C.W.** (1999) Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1410(2):195-213.
- Thornton, N., Stroud, D. A., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., Becker, T.** (2010) Two modular forms of the mitochondrial sorting and assembly machinery are involved in biogenesis of alpha-helical outer membrane proteins. *J Mol Biol.* 396(3):540-9.
- Turzyńska, D., Skórzewska, A., Sobolewska, A., Płaźnik, A.** (2005) Sposoby oddziaływania neuroprotekcynowego w chorobie Parkinsona na przykładzie rasagiliny. *Postępy Psychiatrii i Neurologii* 14(2):145-154.
- Ujwal, R., Cascio, D., Colletier, J. P., Faham, S., Zhang, J., Toro, L., Ping, P., Abramson, J.** (2008) The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(46):17742-17747.
- Walther, D. M., Rapaport, D.** (2009) Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793(1):42-51.
- Wawryn, J., Swieciło, A., Bartosz, G., Biliński, T.** (2002) Effect of superoxide dismutase deficiency on the life span of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. An oxygen-independent role of Cu,Zn-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1570(3):199-202.
- Winterbourn, C. C., Peskin, A.V., Parsons-Mair, H.N.** (2002) Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 277(3):1906-1911.

Wojtczak, L., Slyshenkov, V. S. (2003) Protection by pantothenic acid against apoptosis and cell damage by oxygen free radicals--the role of glutathione. *Biofactors* 17(1-4):61-73.

Woodson, J. D., Chory, J. (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet.* 9(5):383-95.

Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A. J., Yang, W. S., Fridman, D. J., Wolpaw, A. J., Smukste, I., Peltier, J. M., Boniface, J. J., Smith, R., Lessnick, S. L., Sahasrabudhe, S., Stockwell, B. R. (2007) RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 447(7146):864-8.

Young, M.J., Bay, D.C., Hausner, G., Court, D.A. (2007) The evolutionary history of mitochondrial porins. *Evol Biol.* 7(31):1-21.

Zeth, K. (2010) Structure and evolution of mitochondrial outer membrane proteins of beta-barrel topology. *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7):1292-9.

Zyracka, E., Zadrag, R., Koziol, S., Krzepińko, A., Bartosz, G., Biliński, T. (2005) Yeast as a biosensor for antioxidants: simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. *Acta Biochim Pol.* 52(3):679-84.